

Aus dem Walther-Straub-Institut
für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

**Untersuchung der S-Lost-induzierten
Sauerstoffradikalenproduktion in
Keratinozyten**

**Investigation of Sulfur
Mustard-induced Radical Oxygen
Species Formation in Keratinocytes**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sabine Loitsch, geb. Block

aus
Siegburg

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Franz Worek
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. med. Bernhard Liebl
	Prof. Dr. med. Ludwig Meyer
Mitbetreuung durch den promovierten Mitbetreuer:	PD Dr. med. Dirk Steinritz
Dekan:	Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.06.2018

Meinen Eltern

Zusammenfassung

Der erste Einsatz des chemischen Hautkampfstoffes Schwefel-Lost (S-Lost) erfolgte während des Ersten Weltkrieges im Juli 1917 in der belgischen Ortschaft Ypern durch das deutsche Kaiserreich. Bis heute findet S-Lost seine militärische Anwendung: Im aktuell anhaltenden Syrienkonflikt hat der Einsatz chemischer Kampfstoffe verheerende Auswirkungen auf die Zivilbevölkerung. Neben politischen sowie militärischen Bemühungen, einen solchen Einsatz in Zukunft zu unterbinden, ist ein zunehmendes Gefährdungspotenzial durch den terroristischen Einsatz von chemischen Kampfstoffen zu verzeichnen. Trotz intensiver Forschungsmaßnahmen der letzten Jahrzehnte ist bis heute kein Antidot oder eine spezifische Therapie S-Lost-induzierter Schäden gefunden worden, was unter anderem auf die bisher noch nicht vollständig verstandene molekulare Toxikologie dieses Hautkampfstoffes zurückzuführen ist. Daher werden von medizinisch-wissenschaftlicher Seite Anstrengungen unternommen, die Toxikodynamik von S-Lost in seiner Komplexität zu verstehen. Die Theorie der DNA-Schädigung durch Alkylierung scheint dabei nicht ausreichend, um S-Lost-induzierte Schäden vollständig erklären zu können. Nach aktuellem Forschungsstand wird zunehmend oxidativer Stress als eine entscheidende Ursache für die molekulare Toxizität von S-Lost diskutiert. Hier sind reaktive Sauerstoffverbindungen (ROS) für eine zelluläre Schädigung verantwortlich, die sich klinisch in akuten sowie chronischen Gesundheitsstörungen insbesondere auf kutaner und respiratorischer Ebene widerspiegelt.

Diese Arbeit zeigt zunächst einen allgemeinen historischen Überblick über S-Lost hinsichtlich seiner chemischen Entdeckung sowie seines militärischen Einsatzes. Daran anschließend werden die physiko-chemischen Eigenschaften, die klinische Symptomatik mit therapeutischen Möglichkeiten sowie der aktuelle Stand der Wissenschaft zur Toxikodynamik und -kinetik von S-Lost dargestellt. Im methodischen Teil dieser Dissertation erfolgt zunächst der Nachweis des S-Lost-induzierten ROS-Biomarkers 8-Isoprostan in humanen Keratinozyten mittels ELISA und immunhistochemischer Methoden. Grundsätzlich konnte hierbei eine signifikante Erhöhung von ROS-Reaktionsprodukten in den Zellen nachgewiesen werden. Der unmittelbare Nachweis von oxidativem Stress gilt aufgrund der hohen Reaktivität und der damit verbundenen kurzen Halbwertszeit von ROS als herausfordernd. Es wurde dahingehend eine ROS-Detektion mittels des Fluoreszenzfarbstoffes CellROX[®] zu unterschiedlichen Zeitpunkten durch Live-Cell-Imaging durchgeführt. Die S-Lost-induzierte ROS-Freisetzung konnte hierüber bereits unmittelbar nach S-Lost-Exposition belegt werden. In weiteren initialen Versuchen wurden die Auswirkungen von S-Lost auf die Genexpressionsänderung ROS-assoziiierter Gene untersucht und mithilfe des Western Blots auf Proteinebene punktuell validiert. Im Ausblick konnte der Einsatz von ROS-Scavengern auf die S-Lost-induzierte 8-Isoprostan-Bildung untersucht werden.

Abstract

The chemical warfare agent sulphur mustard has first been used by German troops during the First World War at the Belgium town Ypern. Until today, this chemical blister agent finds use in military actions: in the lasting Syrian conflict the use of chemical weapons shows devastating effects on the civilian population. Besides political and military efforts to prevent such use in the future, an increasing risk potential of terrorist attacks can be registered. Despite distinct research in the last decades, no antidote or specific therapy has been found until today, which is to some extent due to the not fully understood molecular toxicology of sulphur mustard. Thus, medical and scientific efforts are undertaken to understand sulphur mustard in its complex mode of action. The theory of DNA-damage through alkylation does not seem sufficient to fully clarify sulphur mustard induced defects. According to the current stage of research, it is hypothesized that oxidative stress may be responsible for the cellular toxicity of sulphur mustard. Here, reactive oxygen species (ROS) are responsible for cellular damage, which are reflected clinically by acute and chronic health disorders, particularly affecting the skin and respiratory system. This thesis first illustrates a general overview of the history of sulphur mustard in terms of its chemical discovery and military use. Following, the physico-chemical properties, clinical symptomatology with treatment options, and the current state of science of toxicokinetics and toxicodynamics of sulphur mustard are discussed. In the methodic part of this dissertation, the detection of the sulphur mustard induced ROS-biomarker 8-Isoprostane is shown in human, primary keratinocytes by ELISA and immunohistochemical methods. Significant increase of ROS-reaction products could be detected in the cells. Due to its high reactivity and short halflife direct detection of ROS is highly challenging. Subsequently, ROS-detection was performed by Live-Cell-Imaging with fluorescent markers of CellROX[®] at different time periods. Sulphur mustard induced ROS release could be detected immediately after sulphur mustard exposure. In further experiments, the effects of sulphur mustard on gene expression were evaluated by DNA-microarray and punctually validated on protein expression level by Western blot. In final experiments, the effects of ROS-scavengers on sulphur mustard induced 8-Isoprostane formation were evaluated.

Eidesstattliche Versicherung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema „Untersuchung der S-Lost-induzierten Sauerstoffradikalenproduktion in Keratinozyten“ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, den 01.07.2018

(Sabine Loitsch)

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Eidesstattliche Versicherung	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VI
1 Zielsetzung der Arbeit	1
2 Einleitung	2
2.1 Entdeckung von Schwefel-Lost (S-Lost)	2
2.2 Einsatz in militärischen Konflikten	2
2.3 Einzug von Alkylanzien in die moderne Medizin	5
2.4 Der chemische Kampfstoff S-Lost	7
2.4.1 Terminologie	7
2.4.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften	7
2.4.3 Klinische Symptomatik	9
2.4.4 Therapie & Prognose	11
2.4.5 Toxikodynamik & Toxikokinetik	13
3 Material & Methoden	18
3.1 Verwendete Materialien & Geräte	18
3.1.1 Reagenzien & Chemikalien	18
3.1.2 Arbeitsmaterialien	19
3.1.3 Zellkulturmaterial	20
3.1.4 Geräte & Software	21
3.2 Methoden	21
3.2.1 Kultivierung primärer Keratinozyten	21
3.2.2 Kultivierung immortalisierter Keratinozyten	23
3.2.3 Zellzahlbestimmung	23
3.2.4 S-Lost-Exposition	24
3.2.5 Immunzytochemie	24
3.2.6 8-Isoprostane ELISA Kit der Firma Enzo	27
3.2.7 8-Isoprostane ELISA Kit der Firma Cayman	28
3.2.8 ROS live cell imaging (CellROX®)	31
3.2.9 Oxidative Stress Array	34
3.2.10 Western Blot	35
3.2.11 ROS-Scavenger	37
4 Ergebnisse & Diskussion	38
4.1 Nachweis von 8-Isoprostan	39
4.2 ROS live cell imaging	44
4.3 Expressionsänderung von ROS-Stressproteinen	49

5	Ausblick	56
6	Literatur	58
7	Danksagung	67
8	Curriculum vitae	68

Abbildungsverzeichnis

2.1	Strukturformel ausgewählter alkylierender Chemotherapeutika	5
2.2	Mycosis fungoides	6
2.3	Psoriasis vulgaris	6
2.4	Strukturformel von S-Lost	8
2.5	Reines und verunreinigtes S-Lost	8
2.6	Kutane Symptomatik nach akzidenteller S-Lost-Exposition	10
2.7	Alkylierung der DNA durch S-Lost	14
3.1	Übersicht Immunzytochemie	25
3.2	Übersicht ELISA	29
3.3	Übersicht Live Cell Imaging	32
3.4	Übersicht ROS - Vergiftung nach Färbung	33
3.5	Übersicht ROS - Vergiftung vor Färbung	34
4.1	8-Isoprostan-Bildung 3 d nach S-Lost-Exposition	40
4.2	Kinetik der S-Lost-induzierten 8-Isoprostan-Bildung	41
4.3	Immunzytochemischer 8-Isoprostan-Nachweis	43
4.4	ROS-Detektion mittels Live-Cell-Imaging	45
4.5	Mikroskopischer Nachweis einer S-Lost-induzierten ROS-Bildung	46
4.6	CellROX®-basierter ROS-Nachweis im zeitlichen Verlauf	48
4.7	Genexpressionsänderung ROS-assoziiierter Gene nach S-Lost-Exposition	51
4.8	Western Blot Untersuchung ausgewählter Proteine	55
5.1	Einfluss von ROS-Scavengern auf die S-Lost-induzierte 8-Isoprostan-Bildung	57

Tabellenverzeichnis

2.1	Physiko-chemische Eigenschaften von S-Lost	9
3.3	Western Blot	36
4.1	Relative Genexpressionsveränderung ROS-assoziiierter Gene nach S-Lost-Exposition	52

1 Zielsetzung der Arbeit

In der Literatur finden sich unterschiedlichste Ansätze, die molekulare Toxizität von S-Lost aufzuklären. Diese reichen von der Theorie einer Säureschädigung des intrazellulär hydrolysierenden S-Losts bis hin zur Theorie der DNA-Schädigung durch die alkylierende Wirkung von S-Lost.^{60,63} Keine dieser Theorien erwiesen sich als abschließende Erklärung für die durch S-Lost verursachten Schäden. Aufgrund dieser noch nicht vollständig geklärten Pathophysiologie existieren bis heute noch kein Antidot oder spezifische therapeutische Maßnahme, um den klinischen Folgen von S-Lost entgegenzuwirken.¹⁰⁶ Ein vielversprechender neuer Erklärungsansatz lässt sich in aktuellen Studien finden, der eine Verbindung zwischen oxidativem Stress und der molekularen Toxizität von S-Lost herzustellen versucht.^{75,84,102} Hiermit ergeben sich auch neue therapeutische Möglichkeiten: So gelangen Eldad *et al.* vor dem Hintergrund, eine Reduktion von S-Lost-induziertem Radikalenstress hervorzurufen, erste Erfolge auf tierexperimenteller Ebene. Anhand eines *in vivo* Schweinehautmodells konnte gezeigt werden, dass die prophylaktische Gabe von Superoxid-Dismutase (SOD) zu einem verbesserten outcome der Versuchstiere führte. Bei therapeutischer Gabe von SOD nach S-Lost-Exposition konnte dieser Effekt jedoch nicht reproduziert werden.³⁰ Vor dem Hintergrund der noch nicht eindeutig geklärten Studienlage hinsichtlich der molekularen Toxizität von S-Lost, ist Gegenstand dieser Dissertation zunächst die Bildung oxidativen Stresses nach S-Lost-Exposition, zu bestätigen. Des Weiteren sollen die spezifische Rolle von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), insbesondere in der frühen Phase einer S-Lost-Exposition in humanen Keratinozyten, herausgearbeitet sowie weitere Erkenntnisse hinsichtlich der zellbiologischen Wirkungen auf Gen- und Proteinebene gewonnen werden.

2 Einleitung

2.1 Entdeckung von Schwefel-Lost (S-Lost)

Im Jahr 1822 nahm die Herstellung von S-Lost seine Anfänge: Dem belgischen Chemiker César-Mansuète Despretz (1798 - 1863) gelang die Reaktion von Schwefelchlorid und Ethylen, die 32 Jahre später durch den französischen Chemiker Alfred Riche (1828-1908) erneut durchgeführt wurde. Die irritativen Eigenschaften von S-Lost wurden erstmals 1860 durch den britischen Wissenschaftler Frederick Guthrie (1833 - 1886) und den deutschen Chemiker Albert Niemann (1834 - 1861) beschrieben:^{43,52,78}

„Die charakteristischste Eigenschaft dieses Öles ist zugleich eine sehr gefährliche. Sie besteht darin, daß selbst die geringste Spur, die zufällig auf irgendeine Stelle der Haut kommt, anfangs zwar keinen Schmerz hervorruft, nach Verlauf einiger Stunden aber eine Röthung derselben bewirkt und bis zum folgenden Tage eine Brandblase hervorbringt, die sehr lange eitert und außerordentlich schwer heilt.“⁷⁸

1868 beschrieb der deutsche Chemiker Viktor Meyer (1848-1897) das chemische Reaktionsprodukt erstmals vollständig und entwickelte zudem eine vereinfachte synthetische Herstellung, die einen höheren Reinheitsgrad der Chemikalie ermöglichte.⁶⁶ Darauf aufbauend verfolgten der deutsche Chemiker Fritz Haber (1868-1934) mit seinen Mitarbeitern Wilhelm Lommel (1875-1968) und Wilhelm Steinkopf (1879-1949) einen militärischen Gebrauch von S-Lost.¹⁰⁰ Durch ihr technisches Verfahren zur industriellen Herstellung, sollte bereits im Ersten Weltkrieg (1914-1918) S-Lost als chemischer Kampfstoff Verwendung finden.⁶³

2.2 Einsatz in militärischen Konflikten

In der Nacht vom 12. auf den 13. Juli 1917 setzten deutsche Truppen in der Nähe der belgischen Ortschaft Ypern erstmalig S-Lost gegen britische Truppen ein.⁴⁴ Die Haager Landkriegsordnung von 1899 und 1907, die laut Artikel 23 „[...] die Verwendung von Gift oder vergifteten Waffen [...]“ sowie den „[...]

Gebrauch von Waffen, Geschossen oder Stoffen, die geeignet sind, unnötige Leiden zu verursachen“²⁵ verboten, fand somit keine Berücksichtigung mehr.

*„Etwa 1,3 Millionen Menschen wurden im Ersten Weltkrieg durch in Massen produzierte Gifte planmäßig geschädigt; 113.000 Tonnen chemischer Kampfstoffe wurden ausgebracht. Spätwirkungen waren unbekannt.“*³³

Zu einem weiteren Einsatz von S-Lost kam es im Rifkrieg (1921 - 1926), dem militärischen Konflikt zwischen Spanien und den Rifkabylen (Berberstamm in Marokko) unter Mohammed Abd al-Karim. Die spanische Führung setzte nach ihrer Niederlage bei Annual (1921) in enger Kooperation mit dem deutschen Chemiker Hugo Stoltzenberg S-Lost ein: 110 Tonnen S-Lost in etwa 10.000 Giftgasbomben wurden bis 1926 auf vornehmlich zivile Ziele der bereits 1923 proklamierten Rif-Republik von spanischen Flugzeugen abgeworfen.^{56,92}

*„Die französische Regierung duldete die spanischen Praktiken ohne Kritik. Sie hatte vom spanisch-deutschen Gasgeschäft Kenntnis, ohne dagegen einzuschreiten, [...]. Auch der britische Geheimdienst wußte vom spanischen Gaseinsatz. [...] Das Völkerbundprotokoll vom 17. Juni 1925, das - während der Hochphase der spanischen Gasangriffe - den Ersteinsatz chemischer Waffen untersagte und sowohl von Frankreich als auch von Spanien ratifiziert wurde, war somit Makulatur.“*⁹²

Bereits ein Jahrzehnt später kam es zum erneuten Bruch des Genfer Protokolls von 1925. Im Italienisch-Äthiopischen Krieg (1935 - 1936), auch Abessinienkrieg genannt, wurde S-Lost sowohl gegen äthiopische Soldaten als auch gegen die dortige Zivilbevölkerung von Seiten Italiens im Rahmen verheerender Luftangriffe eingesetzt.^{7,57} Im Rahmen des Zweiten Weltkrieges (1939 - 1945) setzten in der Nähe von Jaslo (Polen) am 8. September 1939 polnische Truppen S-Lost-Bomben ein. Trotz deutscher Verluste blieb ein Vergeltungsanschlag seitens der deutschen Truppen aus.³⁶ In den folgenden Jahren wurde unter deutscher Führung aus Angst eines Gegenschlages der Alliierten auf den Einsatz von S-Lost verzichtet. Die Befürchtungen des Einsatzes chemischer Kampfwaffen spiegelten sich sowohl in der Äußerung des englischen Premierministers Winston Churchills im Juli 1944 *„Ich wünsche, daß eine kaltblütige Einschätzung [...] darüber vorgenommen wird, ob es günstiger für uns wäre, [...] Giftgas einzusetzen [...]“* als auch in den Vorbereitungsmaßnahmen der USA auf einen Gegenanschlag wider.¹¹⁰ In diesem Rahmen wurden seitens der USA 540 Tonnen S-Lost auf der SS John Harvey in den Hafen Bari, Süditalien transportiert. Ein deutscher Luftwaffenangriff im Dezember 1943 führte unwissentlich zu dessen Freisetzung.¹¹⁰ Das Genfer Protokoll von 1925, dass ein *„Verbot der Verwendung*

*von erstickenden, giftigen oder ähnlichen Gasen sowie von bakteriologischen Mitteln im Kriege.*⁴⁸ vorsah, wurde seitens der deutschen Führung in den Jahren des Zweiten Weltkrieges eingehalten.⁵⁰ Allerdings beinhaltet das Genfer Protokoll keine Aussage über die Erforschung und Produktion chemischer Kampfstoffe, sodass die Herstellung von S-Lost bis 1942 in Ammendorf bei Halle von der Firma ORGACID GmbH stattfand.⁴⁰ In den folgenden Jahrzehnten kam es weltweit zum wiederholten Einsatz von S-Lost: So im ersten Golfkrieg (1980-1988), der durch den S-Lost-Einsatz seitens der Irakischen Regierung über 100.000 verletzte Iraner zur Folge hatte. Noch heute leidet ein Drittel von ihnen unter den Spätfolgen.^{34,52} Auch in heutigen militärischen Auseinandersetzungen spielen chemische Kampfstoffe eine bedeutende Rolle. Dies spiegelt sich in dem seit 2011 anhaltenden Syrienkonflikt wider: So soll es unter dem syrischen Assad-Regime vermutlich zum Einsatz von Sarin gegen die eigene Bevölkerung gekommen sein.⁶ Die Bilanz des Bürgerkrieges ist verheerend: Laut einer Nichtregierungsorganisation, dem Syrischen Zentrum für Politikforschung (SCPR), sind bei gewaltsamen Auseinandersetzungen 470.000 Menschen getötet und 45% der Bevölkerung vertrieben worden.^{12,27} Ein Ansatz, dem zukünftigen Einsatz chemischer Kampfstoffe entgegenzuwirken, stellt das bis heute gültige Verbot der Entwicklung, Herstellung, Lagerung und des Einsatzes chemischer Waffen dar, das seine Grundlage in der bereits 1997 in Kraft getretenen Chemiewaffenkonvention findet. Die Aufgabe der Einhaltung dieser von derzeit 192 Mitgliedstaaten ratifizierten Konvention wird von der Organisation für das Verbot chemischer Kampfstoffe (OPCW) mit Sitz in Den Haag wahrgenommen, deren Mitglieder die Vertragsstaaten des Chemiewaffenabkommens (CWÜ) darstellen.¹⁰⁸ Auch Syrien hat am 14. September 2013 den Beitritt als 190. Mitgliedstaat zur OPCW ratifiziert, welcher 30 Tage später vertragsgemäß in Kraft trat.⁸⁰ Nach Beitritt von Angola und Myanmar zur OPCW im Jahr 2015 stehen noch vier weitere Staaten aus, die das CWÜ nicht ratifiziert haben. Hierzu gehören die Länder Ägypten, Israel, Nordkorea und Südsudan.^{80,108} Das Chemiewaffenabkommen und die OPCW stellen einen wichtigen Schritt dar, dem zukünftigen Einsatz chemischer Kampfstoffe entgegenzutreten. Eine mögliche Bedrohung durch den Einsatz chemischer Kampfstoffe gehört jedoch aufgrund des terroristischen Einsatzes noch nicht vollständig der Vergangenheit an.

2.3 Einzug von Alkylanzien in die moderne Medizin

Einen Nutzen von S-Lost zur Behandlung von Tumorerkrankungen konnten bereits 1931 Adair und Baggin in ihren experimentellen und klinischen Studien belegen.⁴ Während und nach dem Zweiten Weltkrieg wurden die zytostatischen Eigenschaften von Lost-Verbindungen durch die beiden Pharmakologen Gilman und Goodman weiter untersucht. Beide waren auch an der Einführung eines Stickstoff-Lost-Derivats in die Tumorthherapie maßgeblich beteiligt.^{51,109} Auch heute noch finden N-alkyliernde Zytostatika, z. B. Cyclophosphamid, Ifosfamid, Trofosfamid, Chlorambucil und Melphalan (Abb. 2.1) Anwendung in der modernen Chemotherapie und nehmen nach wie vor eine bedeutende Rolle in der Therapie von malignen Erkrankungen ein.⁴⁹

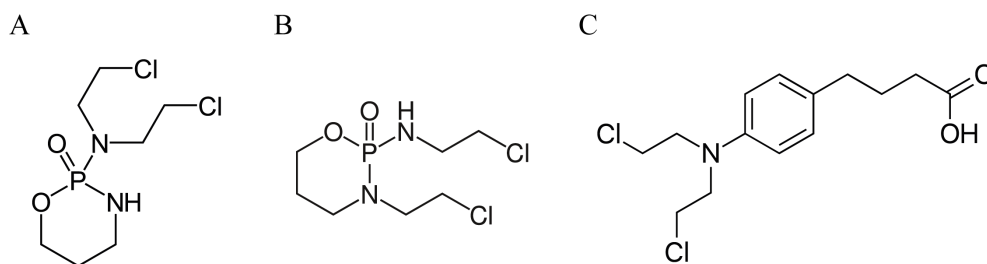


Abbildung 2.1: Strukturformel ausgewählter alkylierender Chemotherapeutika: (A) Cyclophosphamid, (B) Ifosfamid, (C) Chlorambucil ^{modifiziert nach 17,20,46}

Ferner findet Stickstofflost (Mechlorethamin) in der topischen Therapie der primären T-Zell-Lymphome der Haut, wie die Mycosis fungoides (Abb. 2.2, S. 6), ihre Anwendung.¹⁰³ Auch die Behandlung der entzündlichen Dermatose Psoriasis vulgaris (Abb. 2.3, S. 6) mit Hilfe einer S-Lost-Vaseline (0,005%) verzeichnete experimentell einen guten Erfolg. Allerdings ist diese Indikation im klinischen Alltag aufgrund des Karzinogenese-Risikos von S-Lost in der modernen Medizin – auch dank neuer, effektiverer Therapieoptionen – nicht mehr gegeben.^{47,109}



Abbildung 2.2: Mycosis fungoides, Plaquestadium.⁹⁹



Abbildung 2.3: Psoriasis vulgaris.⁹⁹

2.4 Der chemische Kampfstoff S-Lost

2.4.1 Terminologie

Zahlreiche Trivialnamen lassen sich in der Literatur für die im deutschen Sprachraum gängige Bezeichnung S-Lost finden. Der Name S-Lost ist ein Akronym aus den Namensinitialen der beiden deutschen Chemiker Lommel und Steinkopf, die ein Verfahren entwickelten, welches eine großtechnische Synthese für den Einsatz im Ersten Weltkrieg erlaubte. Der scharfe, an Senf oder Meerrettich erinnernde Geruch und die mit einem gelben Kreuz versehenden S-Lost gefüllten Granaten, führten zu den Begriffen, „Senfgas“ (englisch: „mustard gas“) und „Gelbkreuzgas“. Vermutlich durch die Erfahrung geprägt, dass die chemischen Kampfstoffe Chlor und Phosgen beide in einem gasförmigen Zustand eingesetzt wurden, wird fälschlicherweise mit dem Begriff Senfgas ein gasförmiger Zustand beschrieben. Allerdings handelt es sich bei S-Lost um eine ölige Flüssigkeit mit allenfalls mäßigem Dampfdruck. Die ebenfalls oft genutzte Bezeichnung Yperit geht auf den belgischen Ort Ypern zurück, in dem S-Lost 1917 seinen erstmaligen militärischen Einsatz fand. Aufgrund der deutschen Truppenbezeichnung als „Hunnen“ fand die Abkürzung H, die für die Kurzform HS („Hun stuff“, deutsch: „Hunnenstoff“) steht, Einzug in militärische Handbücher. Seit der Herstellung destillierten S-Losts ist auch die Bezeichnung HD („Hun stuff Distilled“) im englischen Sprachraum gebräuchlich. Bis heute stellt sie den gültigen NATO-Code für S-Lost dar. Weitere Synonyme beziehen sich auf die chemische Struktur von S-Lost. Hierunter fallen beispielsweise die Namen Bis-(2-chlorethyl)-thioether, Dichlordiethylsulfid, 2,2'-Dichlor-diethylthioether und Thiodiglycolchlorid.^{51,52,63}

2.4.2 Physikalisch-chemische Eigenschaften

Die Stoffgruppe der Loste setzt sich aus chlorierten, organischen, schwefelhaltigen oder stickstoffhaltigen Verbindungen zusammen. S-Lost gehört dieser Stoffgruppe an und weist als schwefelhaltige Verbindung folgende Strukturformel auf:

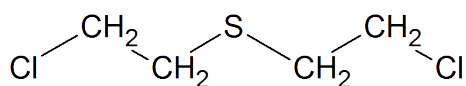


Abbildung 2.4: Strukturformel von S-Lost^{modifiziert nach 74}

Als endständig chloriertes Thioether stellt reines S-Lost eine geruchlose und farblose Flüssigkeit dar. Im Rahmen des Synthetisierungsprozesses können aufgrund von Verunreinigungen ein gelblicher Farbton (Abb. 2.5) und ein Geruch ähnlich dem von Senf, Knoblauch (Allicin), Meerrettich oder Gummi auftreten.²²

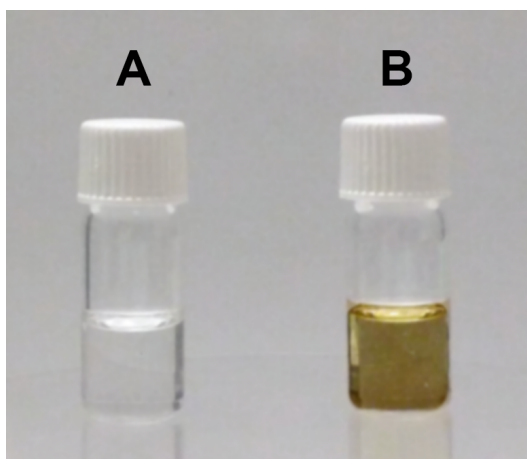


Abbildung 2.5: Reines und technisches S-Lost¹⁵

S-Lost weist einen Gefrierpunkt von 14,5 °C und einen Siedepunkt zwischen 215 °C und 217 °C auf. Neben einer Molekularmasse von 159,08 g/mol besitzt S-Lost einen Dampfdruck von 0,112 mmHg bei 20 °C und eine Dampfdichte von 5,4 (Dichte von S-Lost/Dichte von Luft). S-Lost ist bei einer Dampfdichte von >1 schwerer als Luft und reichert sich somit bodennah an.^{42,63} Als ölige Flüssigkeit zeigt S-Lost eine sehr geringe Wasserlöslichkeit, die in der Literatur mit weniger als 0,1 % angegeben wird. Gut löslich hingegen ist S-Lost in vielen gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln, einschließlich Ethanol, Ether und

Chloroform.⁶³ Im Rahmen der Hydrolyse von S-Lost in wässrigen Medien bilden sich über einen Zwischenschritt zunächst 2-Hydroxyethyl-2-chloroethyl Sulfid und Salzsäure. Das Zwischenprodukt 2-Hydroxyethyl-2-chloroethyl Sulfid hydrolysiert in einem weiteren Schritt in seine beiden Endprodukte Thiodiglycol und Salzsäure.⁵¹ In folgender Reaktionsgleichung wird der Hydrolyseprozess von S-Lost in seine Endprodukte dargestellt:⁶³



Eine Übersicht der physikalisch-chemischen Eigenschaften von S-Lost ist der Tab. 2.1 zu entnehmen.

Tabelle 2.1: Übersicht ausgewählter physiko-chemischer Eigenschaften von S-Lost.^{42,52,63}

Physikalischer Zustand	ölige Flüssigkeit
Chemische Formel	$\text{C}_4\text{H}_8\text{Cl}_2\text{S}$
Molekulargewicht	159,08 g/mol
Dampfdruck	0,032 mmHg bei 10 °C 0,112 mmHg bei 20 °C 0,346 mmHg bei 40 °C
Siedepunkt	215 °C - 217 °C
Gefrierpunkt	14,5 °C
Volatilität	610 mg/m ³ bei 20 °C

2.4.3 Klinische Symptomatik

Der Erstkontakt mit S-Lost ist in den meisten Fällen durch ein charakteristisches symptomfreies Intervall gekennzeichnet, das die Wahrnehmung einer Exposition erschwert. Der an Senf oder Knoblauch erinnernde Geruch ist häufig der einzige Indikator für eine erfolgte Ausbringung.⁵³ Nach einer Latenzzeit von wenigen Stunden zeigen sich klinische Effekte im Bereich der Haut, der Augen und des Respirationstraktes. Systemische Auswirkungen, die mit einer Schädigung des hämatopoetischen und immunologischen Systems verbunden sind, liegen erst bei einer entsprechend hohen Dosis an S-Lost vor.⁵² Die klinischen

Auswirkungen von S-Lost auf die menschliche Haut können in verschiedene Stadien unterteilt werden, die abhängig von Konzentration, Expositionszeit, Temperatur und betroffener Körperregion auftreten. Die leichte Form der S-Lost-Schädigung spiegelt sich in der erythematösen Form wider, die häufig von einem starken Juckreiz begleitet wird und bereits kurz nach der Exposition livide Hyperpigmentierungen verursacht. Höhere S-Lost-Konzentrationen, längere Expositionszeiten, höhere Temperaturen und Hautareale mit einer dünneren Hautschicht (unter anderem Achselhöhlen, Skrotum und Nacken) begünstigen die schwerere Form der Blasenbildung (Abb. 2.6).^{22,24,52,63,101} Die Blasen bilden sich zwischen der Epidermis und der Dermis aus⁸² und weisen klinisch ein positives direktes Nikolski-Zeichen auf⁵¹: Manuelle, tangentiale Hautverschiebung von klinisch unauffälliger Haut führt zur sekundären Blasenbildung. Dieses Phänomen tritt auch bei Erkrankungen der Pemphigus-Gruppe auf und basiert auf den fehlenden Haftungsstrukturen zwischen den Keratinozyten bzw. zur Basalmembran.⁷⁷



Abbildung 2.6: Kutane Symptomatik nach akkzidenteller S-Lost-Exposition.¹⁴

Die Augen weisen als empfindlichstes Organ gegenüber S-Lost zahlreiche Symptome wie brennende Schmerzen, Tränenfluss, Photophobie, Blepharospasmus und Konjunktivitis auf. Die Infektion des Auges stellt dabei eine ernste Folge der S-Lost-Exposition dar und kann bis zum Verlust der Sehkraft führen.

Der Respirationstrakt ist durch Trockenheit und Kratzen im Hals, Heiserkeit, Schleimhautschwellungen im Nasen-Rachen-Raum, Schluckbeschwerden, retrosternale Schmerzen bis hin zur Bronchopneumonie und zum Lungenödem gekennzeichnet. Neben den oben aufgeführten klassischen Symptomen einer S-Lost-Exposition, gibt es auch eine Gruppe unspezifischer Symptome, die während des Ersten Weltkrieges beschrieben wurden. Hierzu zählen unter anderem Hypotension, Apathie und geistige Verwirrungszustände.⁶³

2.4.4 Therapie & Prognose

Die medizinische Versorgung beschränkt sich aufgrund fehlender Antidota auf die Dekontamination sowie symptomatische Therapie.⁴² Ein optimaler Selbstschutz in Form einer effektiven Schutzbekleidung muss bei jeder Behandlung von S-Lost-Patienten gegeben sein. Unter Einhaltung des Eigenschutzes wird der Patient aus seiner kontaminierten Umgebung befreit, um nach Entfernung jeglicher kontaminierter Kleidung eine lokale Dekontamination durchzuführen.^{52,63} Maßnahmen für eine optimale Dekontamination sind bis dato nicht vollständig geklärt. Bei einer kutanen Exposition mit flüssigem S-Lost empfiehlt sich zunächst ein Abtupfen von S-Lost mittels eines saugenden Materials, wie z.B. Zellstoff oder auch RSDL (Reactive Skin Decontamination Lotion).¹¹⁵ Zudem sollte durch die Reinigung der betroffenen Haut mit Seifenlauge zur Dekontamination beigetragen werden. Zusätzlich kann eine oxidierende Chloramin T-Lösung (Tosylchloramid-Natrium) frühzeitig äußerlich eingesetzt werden, da sie neben ihrer Wirkung als Oxidationsmittel auch durch ihre antiseptische Eigenschaft eine desinfizierende Wirkung aufweist. Bei Affektion der Augen ist eine Spülung für mindestens 15 Minuten mit Wasser bzw. physiologischer Kochsalzlösung durchzuführen.⁹⁸ Innerhalb der ersten 30 Minuten ist auch eine intravenöse Gabe einer 10 % Natriumthiosulfatlösung in einer Dosis von 100 - 500 mg/kg KG (Körpergewicht) möglich, die zur Aufhebung der resorptiven Lostwirkung beitragen kann.^{22,63,73} Neuere Studien empfehlen die Gabe von N-Acetylcystein als Off-Label Use.⁹⁸ Die sich anschließende klinische Weiterbehandlung erfolgt symptomorientiert. Auch die Applikation lokaler Glukokortikosteroide findet ihren Einsatz. Der Pruritus kann mit antihistaminhaltigen Salben gelindert werden, zeigt sich jedoch häufig gegenüber Antihistaminika resistent.⁹⁸ Die neben dem Erythem auftretenden Hautblasen werden analog zu Verbrennungen 2. Grades behandelt. Unter kontrollierten klinischen Bedingungen sollten die Blasen zur besseren Beurteilung des Wundgrundes eröffnet werden. Aufgrund der Infektionsgefahr sollte dies in Situationen ohne ärztliche Betreuung vermie-

den werden.²² Bei Augenkontakt mit S-Lost ist eine frühe Dekontamination durch eine Augenspülung von entscheidender Bedeutung.⁶³ Als Spüllösungen dienen physiologische Lösungen (z.B. 0,9 % NaCl-Lösung) sowie Wasser. Sterile Vaseline verhindert ein Zusammenkleben der Lidränder, sollte aber aufgrund der Gefahr, ein lipophiles Depot zu setzen, nicht vor der Dekontamination eingesetzt werden.^{22,109} Um einem Lungenödem vorzubeugen, wird von einigen Autoren die inhalative Anwendung eines Beclometason-Aerosols (fünf Hübe alle 10 Minuten) nach einer pulmonalen Exposition empfohlen.²¹ Allgemeine Therapien, wie Antibiotikagabe bei Sekundärinfektion, Volumen- und Elektrolytersatz sowie Bluttransfusionen als auch parenterale Ernährung kommen individuell zum Einsatz.²²

Schon früh prägte Paracelsus (1493 - 1541) den noch heute gültigen Grundsatz: „*Dosis sola venenum facit.*“ – Allein die Dosis macht das Gift. Dieses spiegelt sich auch in der Abheilung lokaler S-Lost-Schäden wider, welche dosisabhängig ist.²² Somit gestaltet sich eine exakte Prognose für S-Lost-Geschädigte als schwierig, doch existieren grobe Richtlinien: Die Abheilung betroffener Hautläsionen weist je nach Tiefe der Läsion eine unterschiedliche Prognose auf. Während oberflächliche Hautläsionen in der Regel zwei bis drei Wochen zur Heilung benötigen, sind tiefe Läsionen schätzungsweise erst innerhalb von 60 Tagen ausgeheilt, oder zeigen keinerlei Heilungstendenz. In solchen Fällen ist eine Spalthautdeckung erforderlich. Verletzungen des Auges liegen zeitlich dazwischen: Die meisten Augenverletzungen sind vier Wochen nach Exposition verheilt.⁶³ Bei S-Lost-verursachten Lungenschäden ist eine prognostische Aussage bezüglich einer vollständigen Regeneration der Lunge besonders schwer zu treffen. Akute, durch S-Lost-hervorgerufene Lungenschäden können in chronische Lungenerkrankungen übergehen. Diese können direkt im Anschluss an die akute Phase, jedoch auch Jahre nach der Exposition auftreten und werden unter dem Begriff „*Mustard Lung*“ zusammengefasst.^{9,37,52} Bei der Entwicklung einer chronischen Lungenerkrankung stellen produktiver Husten und Dyspnoe typische Symptome dar.^{38,39} Es können sowohl obstruktive als auch restriktive Lungenerkrankungen resultieren. Ist der untere Respirationstrakt betroffen, zeigen sich häufig pathologische Werte im Lungenfunktionstest mit einer verminderten Einsekundenkapazität (FEV1) und einer reduzierten forcierten expiratorischen Vitalkapazität (FVC).³⁸ Die „*Mustard Lung*“ ähnelt im klinischen Bild dabei der einer chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) und ist maßgeblich für die Morbidität der Patienten verantwortlich.^{31,63,91}

2.4.5 Toxikodynamik & Toxikokinetik

Zahlreiche Theorien wurden bezüglich des Pathomechanismus von S-Lost aufgestellt. Diese reichen von der Theorie einer Säureschädigung des intrazellulär hydrolysierenden S-Losts, bis hin zur Theorie, dass S-Lost mit Proteinen reagiert und essentielle Enzyme, darunter die Hexokinase, hemmt.^{26,60} Des Weiteren werden eine intrazelluläre Calciumerhöhung mit einhergehendem Zelltod sowie eine Auslösung inflammatorischer Prozesse durch S-Lost diskutiert.⁴² Keine dieser Theorien erwiesen sich als abschließende Erklärung für die durch S-Lost verursachten Schäden. Gegenwärtig besitzt die alkylierende Wirkung auf zelluläre Bestandteile die größte Akzeptanz unter den bisherigen Theorien: Die 2-Chlorethylseitenketten des S-Losts durchlaufen eine intramolekulare Zyklisierung unter Freisetzung eines Chloridions. Das entstandene Sulfoniumkation wandelt sich anschließend in ein Carboniumion um, welches als hoch reaktives Zwischenprodukt mit Nukleophilen, wie der DNA, RNA, Proteinen und anderen Molekülen reagiert.^{52,63} Die bevorzugte Position der DNA-Alkylierung stellt hierbei mit etwa 60 % die N7 Position der DNA-Base Guanin dar.⁸¹ Die schematische Darstellung der Reaktion zu N7-HETE-G ist der Abbildung 2.7, Seite 14 zu entnehmen:

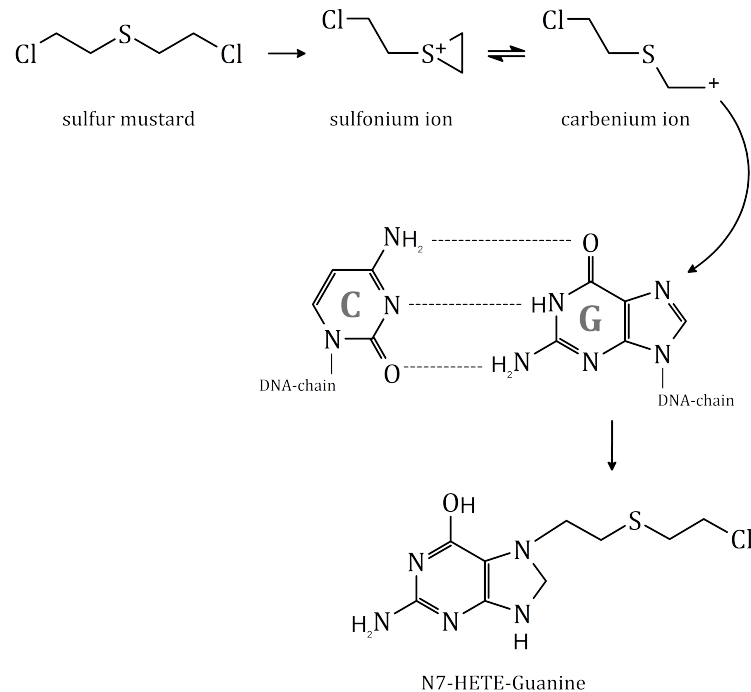


Abbildung 2.7: Alkylierung der DNA durch S-Lost. Nach einer Exposition reagiert S-Lost vornehmlich mit dem N7-Atom der DNA-Base Guanin.^{modifiziert nach 53}

Im Anschluss an die Alkylierung der DNA wird die kovalent modifizierte Purinbase enzymatisch entfernt. Der resultierende Strangbruch führt zu einer übermäßigen Aktivierung der PARP-1 (poly(ADP-ribose) polymerase, Typ 1), was folgende zellbiologische Konsequenzen beinhaltet:^{32,52}

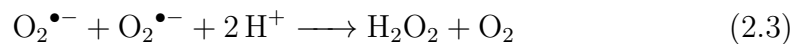
- erhöhte PARP-1 Aktivität → Verbrauch und resultierender Mangel von NAD^+ durch PARP-1 → Glykolysehemmung → ATP-Mangel → Zellnekrose
- Strangbruch → Stimulation der DNA-Reparatur → bei zu großem Schaden Initiierung der Apoptose → Aktivierung der Caspase 3 → PARP-1 stellt ein Substrat der Caspase 3 im Rahmen der Apoptose dar

Neben der alkylierenden Wirkung von S-Lost wird oxidativer Stress als eine entscheidende Ursache für die molekulare Toxizität von S-Lost diskutiert.^{75,84,102} Oxidativer Stress ist als eine Stoffwechsellaage definiert, die durch eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen

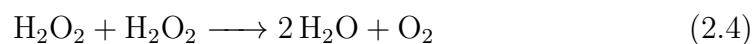
(ROS, reactive oxygen species) charakterisiert ist.⁹³ Unter dem Begriff ROS werden Radikale wie das Superoxid-Anion $\text{O}_2^{\bullet-}$, Wasserstoffperoxid H_2O_2 sowie das hochreaktive Hydroxylradikal OH^\bullet subsummiert. Reaktive Sauerstoffverbindungen entstehen endogen als Nebenprodukt der mitochondrialen Atmungskette. Hier kommt es häufig zu einer fehlerhaften Elektronenübertragung, indem während des Elektronentransports lediglich ein Elektron auf molekularen Sauerstoff übertragen wird. So entsteht das sehr reaktive Superoxidradikal:⁵⁴



Trifft es mit einem weiteren Superoxidradikal zusammen, bilden sich durch Disproportionierung Sauerstoff (O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2):⁸⁷

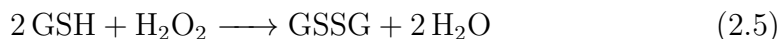


Neben dem hochreaktiven Wasserstoffperoxid (H_2O_2) kann ebenfalls ausgehend von Superoxidradikalen das elektrisch neutrale und aggressive Hydroxylradikal (OH^\bullet) entstehen.⁸⁷ Diese verschiedenen hochreaktiven Sauerstoffverbindungen (Superoxidradikal, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikal) besitzen als freie Radikale eine hochreaktive Eigenschaft und reagieren in Zellen mit verschiedenen Molekülen wie Proteinen (Proteinoxidation), Lipiden (Lipidperoxidation) oder Nukleinsäuren (DNA-Schädigung). Diese ablaufenden Reaktionen schädigen die jeweiligen Zellstrukturen und führen einen zellulären Funktionsverlust oder eine Mutation herbei.⁵⁴ Damit eine übermäßige Zellschädigung durch hochreaktive Sauerstoffverbindungen verhindert wird, besitzt der menschliche Körper sowohl enzymatische als auch nicht-enzymatische Schutzsysteme. So katalysieren Enzyme wie die Superoxid-Dismutase (SOD) und die Katalase Disproportionierungen: Die Reaktion der beiden Superoxidradikale zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid wird durch die SOD beeinflusst. Die weitere Disproportionierung von Wasserstoffperoxid zu Sauerstoff und Wasser läuft mit Hilfe der Katalase ab:⁸⁷



Ein weiterer Schutzmechanismus wird durch Antioxidanzien bereitgestellt. Hierzu zählen unter anderem Vitamin C (Ascorbinsäure), Vitamin E (Tocopherol), einige Carotine und Glutathion. Das Tripeptid Glutathion (Glutamat, Cystein und Glycin, GSH) sorgt enzymunabhängig für die Aufrechterhaltung reduzierender Bedingungen in menschlichen Zellen: Die Thiol-Gruppe des Cysteins kann durch hochreaktive Verbindungen oxidiert werden und es kann zur Anlagerung

von zwei Glutathionmolekülen über eine Disulfidbrücke kommen:⁸⁷



Anschließend wird das oxidierte Glutathion-Disulfid (GSSG) mittels der Glutathion-Reduktase und seinem Kofaktor NADPH zum Glutathion reduziert.^{63,87} In der Literatur werden verschiedene Zusammenhänge zwischen S-Lost und der Entstehung von Sauerstoffradikalen diskutiert. Unter anderem stellten Arroyo *et al.* eine durch S-Lost ausgelöste TNF α -Freisetzung aus Monozyten fest.⁵ Der Tumornekrosefaktor TNF α ist dabei für die Initiierung der durch die Xanthinoxidase katalysierten Umwandlung von Sauerstoff in Superoxidradikale verantwortlich.¹¹¹ Des Weiteren konnten Levitt *et al.* eine durch S-Lost ausgelöste, direkte Sauerstoffradikalfreisetzung aus Granulozyten nachweisen.⁵⁹

Die Resorption von S-Lost über die Haut sowie über die Atemwege sind als die klinisch relevanten Aufnahmewege anzusehen. Eine perkutane Aufnahme wird durch die hohe Lipophilie begünstigt³²: Während ca. 80 % des mit der menschlichen Haut in Kontakt getretenen S-Losts bereits an der Hautoberfläche evaporieren, verbleiben ca. 12 % lokal in der Haut.⁸⁹ Die übrige S-Lost-Menge von ca. 8 % gelangt in den systemischen Kreislauf.^{19,85,89} Bereits nach Exposition gegenüber niedrigen S-Lost-Aerosolen, die nur eine punktuelle Blasenbildung zur Folge hatte, konnten eindeutig S-Lost-Protein Addukte im Plasma nachgewiesen werden, was zweifelfrei die Aufnahme signifikanter Mengen S-Lost belegt.⁹⁷ Höhere Temperaturen und Luftfeuchtigkeit erhöhen die Eindringgeschwindigkeit an der Haut, die mit ca. 0,001 mg/cm² pro Minute angegeben wird.²² Um einen dermatologischen Effekt in Form von Blasenbildung zu erzeugen, sind 20 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ flüssigen S-Losts notwendig.⁸² Andere Berichte beschreiben klinische Effekte bereits bei einer Exposition gegenüber S-Lost im Bereich von 4 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.⁷⁶ Möglicherweise begünstigt die Evaporation von 80 % des flüssigen S-Losts vor Penetration in die Haut die Exposition eines größeren Hautareals.⁸⁹ Die lipophile hochreaktive Eigenschaft von S-Lost ermöglicht es zudem, in den oberen Atemwegen resorbiert zu werden. Bis in die unteren Atemwege kann S-Lost bei Vorliegen einer hohen Konzentration vordringen und hier starke Gewebeschäden hervorrufen.^{37,114,116} Die systemische Verteilung von S-Lost scheint am besten mit einem 2-Phasen-Verlauf beschreibbar zu sein. *In vitro* wurde anhand eines solchen Modells eine initiale α -Halbwertszeit von circa fünf Minuten und eine terminalen β -Eliminationshalbwertszeit von circa 3,5 Stunden bestimmt.⁶² Hierbei konnte in einem Bildgebungsverfahren mit Hilfe von radioaktiv markiertem S-Lost eine vermehrte Ansammlung in der nasalen Region, den Nieren, der Leber sowie dem Darm nachgewiesen werden.¹⁸

Bei der Metabolisierung spielen vor allem die Hydrolyse zu Thiodiglycol sowie die Konjugation mit Glutathion eine entscheidende Rolle.³² Die Elimination der S-Lost-Metabolite erfolgt durch die renale Filtration über den Urin.⁵² In diesem Zusammenhang konnten tierexperimentelle Daten aufzeigen, dass 80 % der Radioaktivität von ¹⁴C-markiertem S-Lost im Urin gefunden und nur geringe Anteile über die Fäzes ausgeschieden wurden.²³ Nicht-hydrolysiertes S-Lost kann im menschlichen Gehirn und Fettgewebe noch nach Tagen der Exposition nachgewiesen werden.²⁸

3 Material & Methoden

3.1 Verwendete Materialien & Geräte

3.1.1 Reagenzien & Chemikalien

Substanz	Hersteller / Lieferant
2,2'-Dichlordiethylsulfid (S-Lost)	Bundesministerium der Verteidigung, Bonn, DEU
8-Isoprostane Affinity Purification Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
8-Isoprostane antibody (polyclonal, goat)	Abnova, Heidelberg, DEU
8-Isoprostane ELISA Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
8-iso-PGF2 α ELISA Kit	Enzo, Lörrach, DEU
Antibody Diluent	Dako, Hamburg, DEU
BHT	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
CellROX [®] Oxidative Stress Reagents	Life Technologies, Darmstadt, DEU
cOmplete [™] , Mini Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Cox2 Antibody	Cell Signaling Technology [®] , Cambridge, GB
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Dithiothreitol (DTT)	abcam [®] , Cambridge, GB
EDTA (1mM)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Entellan [®]	Omikron, Rietberg, DEU
Ethanol (> 99,9 %)	VWR Prolabo [®] , Darmstadt, DEU
γ GCS _c (H-5) Antibody	Santa Cruz, Heidelberg, DEU
Goat IgG antibody (Cy3)	GeneTex, Irvine, USA
H ₂ O ₂ (30 % in H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Hämalaun	Bio-Optica, Milano, ITA
HO-1 Antibody	Cell Signaling Technology [®] , Cambridge, GB
Immobilon [®] -P PVDF Membrane	Merck Millipore, Darmstadt, DEU
ImPRESS Anti-Goat IgG Reagent	Vector Laboratories, Burlingame, USA
IRDye [®] 800 CW Donkey anti-Rabbit IgG	LI-COR [®] Biosciences, Bad-Homburg, DEU
IRDye [®] 800 Donkey anti-Mouse IgG	LI-COR [®] Biosciences, Bad-Homburg, DEU
Kaliumhydroxid (15 %)	Merck Millipore, Darmstadt, DEU
L-Glutathione reduced	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Methanol	VWR Prolabo [®] , Darmstadt, DEU
N-Acetyl-L-cysteine	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU

NuPAGE™ 4-12 % Bis-Tris Protein Gels, 1,0 mm, 10 well	Thermo Scientific, Schwerte, DEU
Oxidative Stress Defense WB Cocktail	abcam®, Cambridge, GB
PFA (4 % in PBS, pH 7,4)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Phosphat (1 M)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Protein Block Serum-Free	Dako, Hamburg, DEU
Protein Determination Kit	Cayman Chemical, Ann Arbor, USA
Protein Sample Loading Buffer	LI-COR® Biosciences, Bad-Homburg, DEU
RNeasy Mini Kit	QIAGEN, Hilden, DEU
RT ² First Strand Kit	SABiosciences, QIAGEN, Hilden, DEU
RT ² SYBR® Green ROX qPCR Mastermix	SABiosciences, QIAGEN, Hilden, DEU
Synergy Ultrapure Water System	Merck Millipore, Darmstadt, DEU
TBS Blocking Solution	LI-COR® Biosciences, Bad-Homburg, DEU
Tris-Puffer (20 x)	DCS LabLine, Hamburg, DEU
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Xylol	Avantor, Center Valley, USA

3.1.2 Arbeitsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller / Lieferant
Deckgläschen	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Einfrierbox Nalgene® Mr. Frosty®	Thermo Scientific, Schwerte, DEU
Handdispenser Multipette plus	eppendorf, Hamburg, DEU
Kryoröhrchen Nalgene® cryogenic vials	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
Messpipetten (1 - 2 ml) Falcon®	BectonDickinson, Heidelberg, DEU
Messpipetten (5 - 10 - 25 ml) Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, DEU
Mikroliterpipetten Research® plus	eppendorf, Hamburg, DEU
Neubauer-Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe, DEU
Objektträger Superfrost® Plus Gold	Thermo Scientific, Schwerte, DEU
Pipettenspitzen, ep Dualfilter T.I.P.S.®	eppendorf, Hamburg, DEU
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann, Eberstadt, DEU
Zellkulturflaschen (175 cm ² & 75 cm ²)	greiner bio-one, Frickenhausen, DEU
Zellkulturflaschen (25 cm ²) Falcon®	BectonDickinson, Heidelberg, DEU
Zellkulturplatte 96 Well µCLEAR	greiner bio-one, Frickenhausen, DEU
Zellkulturplatte 24 Well Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, DEU
Zellkulturröhrchen 15 ml Falcon®	BectonDickinson, Heidelberg, DEU
Zellkulturröhrchen 50 ml Cellstar®	greiner bio-one, Frickenhausen, DEU
Zellkulturschale CELLview™	greiner bio-one, Frickenhausen, DEU

3.1.3 Zellkulturmaterial

Zelllinie	Zelltyp	Hersteller / Lieferant
NHEK	normale humane epidermale Keratinozyten	PromoCell, Heidelberg, DEU
HaCaT	spontan immortalisierte humane Keratinozyten	CLS, Eppelheim, DEU

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
NHEK	
Kulturmedium	Growth Medium 2 + Supplement Mix + CaCl ₂
Einfriermedium	80 % Kulturmedium + 10 % FBS + 10 % DMSO
HaCaT	
Kulturmedium	500 ml DMEM + 26 ml FBS
Einfriermedium	70 % Kulturmedium + 20 % FBS + 10 % DMSO

Substanz	Hersteller / Lieferant
Calciumchlorid (0,5 M)	PromoCell, Heidelberg, DEU
DMEM	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DEU
DMSO (99,9 %)	Sigma-Aldrich, Dreisenhofen, DEU
FBS	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DEU
Keratinocyte Growth Medium 2	PromoCell, Heidelberg, DEU
Keratinocyte Supplement-Mix	PromoCell, Heidelberg, DEU
PBS (ohne Ca & Mg, pH 7,4)	PAA, Cölbe, DEU
Trypsin/EDTA (0,04 %/0,03 %)	PromoCell, Heidelberg, DEU
Trypsin-EDTA (0,05 %)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt, DEU
Trypsin Neutralisierungslösung	PromoCell, Heidelberg, DEU

3.1.4 Geräte & Software

Gerät / Software	Hersteller/Lieferant
Analysen- und Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, DEU
CASY® TTC 150	Schärfe System, Reutlingen, DEU
Fluoreszenzmikroskop Axioplan	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DEU
Hellfeldmikroskop Axiovert 40C	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DEU
HistoQuest 4.0	TissueGnostics, Wien, AUT
Image Studio™ Odyssey® Classic	LI-COR® Biosciences, Bad-Homburg, DEU
Laser-Scanning-Mikroskop LSM 710	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DEU
Magnetrührer RET & RH basic	IKA, Staufen, DEU
Mastercycler® RealPlex ²	Eppendorf, Hamburg, DEU
Mikroplattenleser Infinite® M200 PRO	Tecan, Crailsheim, DEU
NanoDrop 8000	Thermo Scientific, Schwerte, DEU
pH-Meter MP230	Mettler Toledo, Gießen, DEU
Prism® 5.02	GraphPad Software Incorporated, San Diego, USA
Schüttler KS 250 basic	IKA, Staufen, DEU
Tecan Roboter Freedom EVO® Series	Tecan, Crailsheim, DEU
Tischzentrifuge Rotina 35R	Hettich, Tuttlingen, DEU
TissueFAXS	TissueGnostics, Wien, AUT
Ultraschallhomogenisator	Bandelin electronic, Berlin, DEU
Vortex MS 3 digital	IKA, Staufen, DEU
Wärmeschrank Memmert INE 200	Kendro, Langenselbold, DEU
Zellinkubator Galaxy 48 R&S	Eppendorf, Hamburg, DEU
Zellinkubator HERAcell 150i	Thermo Scientific, Schwerte, DEU

3.2 Methoden

3.2.1 Kultivierung primärer Keratinozyten

Normale, humane, epidermale Keratinozyten (NHEK) wurden von der Firma PromoCell zum Zeitpunkt der Passage 2 kryokonserviert und als 500.000 Zellen enthaltene Vial an uns geliefert. Um die in Flüssigstickstoff gelagerten Zellen in Kultur nehmen zu können, wurde zunächst eine 75 cm² große Kulturflasche mit 9 ml Kulturmedium befüllt und anschließend für 30 Minuten in einem Zellinkubator bei 37°C und 5 % CO₂ (Kohlendioxid) vortemperiert. Hinsichtlich des verwendeten Kulturmediums handelte es sich um das serumfreie Keratinozyten Wachstumsmedium, das durch Hinzugabe der CaCl₂ (Calcium-Chlorid)-Lösung und des SupplementMix zu 500 ml Basalmedium hergestellt wurde. Unter

Trockeneislagerung wurde das Vial vom Flüssigstickstoffbehältnis ins Zellkulturlabor transportiert. Hier erfolgte unter Abzug ein vorsichtiges Aufdrehen der Vialkappe zu einem Viertel, damit eine Druckentweichung möglich war. Anschließend wurde das Vial wieder verschlossen und für 2 Minuten in einem Wasserbad bei 37 °C erwärmt. Nach Desinfektion des Vials mittels 70 % Ethanol wurde unter Abzug die Überführung der Zellsuspension in die mit Medium vortemperierte Kulturflasche durchgeführt. Die Aussaatdichte lag bei 6.666,7 Zellen/cm². Zur Zelladhäsion wurde die Kulturflasche bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Inkubator für die nächsten 16 - 24 Stunden platziert. Nach diesem Zeitraum erfolgte ein Mediumwechsel, der alle 2 Tage wiederholt wurde. Nach Erreichen einer Zellkonfluenz von 80 % (entspricht circa 5 - 7 Mio. Zellen), wurde zur Vermeidung einer kontaktinduzierten zellulären Weiterdifferenzierung ein Passagieren der Keratinozyten erforderlich. Hierzu erfolgte nach vorsichtiger Aspiration des Mediums aus der Kulturflasche ein Waschschriff mit 8 ml PBS (Phosphate Buffered Saline) für circa 15 Sekunden. Zur Ablösung der Zellen wurden 3 ml des bereits bei Raumtemperatur aufgewärmten Trypsin/EDTA (0,04 %/0,03 %) hinzugegeben. Die Zellen inkubierten zunächst unter mikroskopischer Beobachtung für 3 Minuten bei Raumtemperatur. Mit Beginn der Ablösung wurden durch vorsichtiges Beklopfen der Zellen zugewandten Kulturflaschenseite die restlichen adhärenen Zellen gelöst. Anschließend inkubierten die Zellen für weitere 3 Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂ und erhielten darauf folgend 3 ml der Trypsin Neutralisierungslösung (0,05 % Trypsin Inhibitor in 0,1 % BSA). Nach vorsichtigem Schwenken der Kulturflasche wurde die enthaltene 6 ml Zellsuspension in ein 15 ml Zellkulturröhrchen überführt und bei 1100 rcf für 5 Minuten abzentrifugiert. Während der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in 1 ml Kulturmedium resuspendiert. Zu diesem Zeitpunkt der Passage konnte eine Bestimmung der Zellzahl (siehe Kapitel 3.2.3) durchgeführt werden, um eine sinnvolle Aufteilung der Zellsuspension auf weitere 75 cm² große Kulturflaschen zu ermöglichen. Hierbei gilt, dass bei einer 80 %igen Konfluenz die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:5 ausplattiert wird. Für ein erneutes Einfrieren wurden die abzentrifugierten Zellen in einem Einfriermedium resuspendiert. Das Volumen des Einfriermediums wurde dabei so gewählt, dass ein Aliquot von 1 ml mit einer Zellzahl zwischen 0,5 und 1,0 Mio. auf ein Kryoröhrchen überführt werden konnte. Die Röhrchen wurden über Nacht bei -80 °C in einer Einfrierbox gelagert, die ein kontrolliertes Einfrieren der Zellen mit -1 °C pro Minute ermöglichte. Nach initialem Einfrieren in der Einfrierbox konnten die Zellen am nächsten Tag in einem Flüssigstickstoffkontainer gelagert werden.

3.2.2 Kultivierung immortalisierter Keratinozyten

Die HaCaT-Zellen (Human adult low Calcium high Temperature) sind spontan immortalisierte humane Keratinozyten, die in kryokonservierter Form bei der Firma CLS (Cell Lines Service) erworben wurden. Der Auftau- und Einfrierungsprozess ähnelt dem der primären Keratinozyten, sodass an dieser Stelle nur die Unterschiede hervorgehoben werden: Das hier zum Einsatz kommende Kultur- und Einfriermedium setzte sich wie unter Kapitel 3.1.3 aufgeführt zusammen. Das Aussäen der Zellen erfolgte in einer 175 cm² großen Kulturflasche. Hinsichtlich des Passagiervorganges weisen HaCaT-Zellen im Vergleich zu den primären Keratinozyten einen vereinfachten Ablauf auf: Nachdem das alte Medium der zu passagierenden Zellen der Kulturflasche verworfen wurde, wurden 3 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) zur Reinigung und Neutralisierung des alten FBS hinzugegeben. Nach einer kurzen Einwirkzeit von unter 10 Sekunden wurden die 3 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) wieder abgesaugt und durch erneutes Trypsin-EDTA (0,05 %) gleicher Menge ersetzt. Die anschließende Inkubation bei 37 °C lag zeitlich bei ungefähr 10 Minuten. Das Ablösen der Zellen wurde durch zwischenzeitliches Beklopfen der Kulturflasche erleichtert. Ließen sich unter dem Lichtmikroskop keine adhärenen Zellen mehr finden, wurden die 3 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) mit 22 ml Kulturmedium zu einer homogenen Zellsuspension durchmischt, von der eine Bestimmung der Zellzahl mittels automatischem Zellzähler (siehe Kapitel 3.2.3.2) oder Neubauer Zählkammer (siehe Kapitel 3.2.3.1) durchgeführt wurde. Je nach erforderlicher Zellzahl und zeitlichem Versuchsrahmen wurden die 25 ml Zellsuspension auf die entsprechende Anzahl von Zellkulturfläschchen verteilt und jeweils mit dem vorgewärmten Nährmedium zu einem Endvolumen von 30 ml ergänzt. Die Lagerung der Zellkulturflaschen erfolgte im Zellinkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

3.2.3 Zellzahlbestimmung

3.2.3.1 Neubauer Zählkammer

Der Hämozytometer lässt eine lichtmikroskopische Zählung von Zellen zu. Der optischen Spezialglasplatte mit dem unter Druck aufgelegten Hämozytometer-Deckgläschen (20 x 26 mm) wurden 10 µl der zu zählenden Zellsuspension seitlich aufpipettiert. Durch Kapillarkraft sog sich die Zellsuspension in den Zwischenraum von Deckgläschen und Glasplatte. Bei Durchlicht wurden unter dem Lichtmikroskop bei insgesamt 9 vorliegenden Großquadraten die Zellen gezählt, die sich in den 4 großen Eckquadraten befanden. Die Summe der Zellen

wurde zur Ermittlung des Mittelwertes durch 4 dividiert und anschließend mit dem Faktor 10.000 multipliziert. Das sich daraus bildende Produkt gab die Zellzahl pro Milliliter an.

3.2.3.2 Automatisierte Zellzählung mittels CASY®

Der elektronische Zellzähler basiert auf dem Widerstandsprinzip und ermöglicht die Bestimmung der Zellzahl, des Zellvolumens, des Aggregationsgrades und der Zellgrößenverteilung. Vor jeder Messung erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes und eine Kontrollspülung der Kapillare mittels einer isotonen Salzlösung. 100 µl der Zellsuspension wurden entnommen und auf ein bereits mit 10 ml der isotonen Salzlösung befülltes Messgefäß überführt. Nach vorsichtigem Vermischen konnte die Messung durchgeführt werden, die die Zellzahl pro Milliliter lieferte. Nach der Messung wurde die Kapillare erneut mit isotoner Salzlösung gespült und wöchentlich mit CASY® clean gereinigt.

3.2.4 S-Lost-Exposition

Reines 2,2'-Dichlordiethylsulfid (S-Lost) wurde über das Bundesministerium der Verteidigung zur Verfügung gestellt. Zur Herstellung der spezifischen S-Lost-Endkonzentrationen von 30 bis 1000 µM wurde zunächst eine 400 mM Lösung hergestellt. Hierzu wurden 10 µl reines S-Lost (8 M) in 190 µl absolutem Ethanol gelöst. Ausgehend von dieser 400 mM Lösung wurden über zwei weitere Verdünnungsschritte die jeweiligen Endkonzentrationen hergestellt. Als Verdünnungsmedium diente je nach zu vergiftender Zelllinie das entsprechende Kulturmedium.

3.2.5 Immunzytochemie

3.2.5.1 Hintergrund

Die Immunzytochemie nutzt die Spezifität von Antikörpern, um eine spezifische Antigenverteilung sichtbar zu machen. Die Detektion der Antigen-Antikörperkomplexe erfolgt hierbei über unterschiedliche Markersubstanzen, wie Fluorochrome oder Enzyme.^{13,72} Im Folgenden wird der immunhistochemische Nachweis oxidativen Stresses mittels enzymgekoppelter Sekundärantikörper aufgeführt.

3.2.5.2 Probenvorbereitung und Durchführung

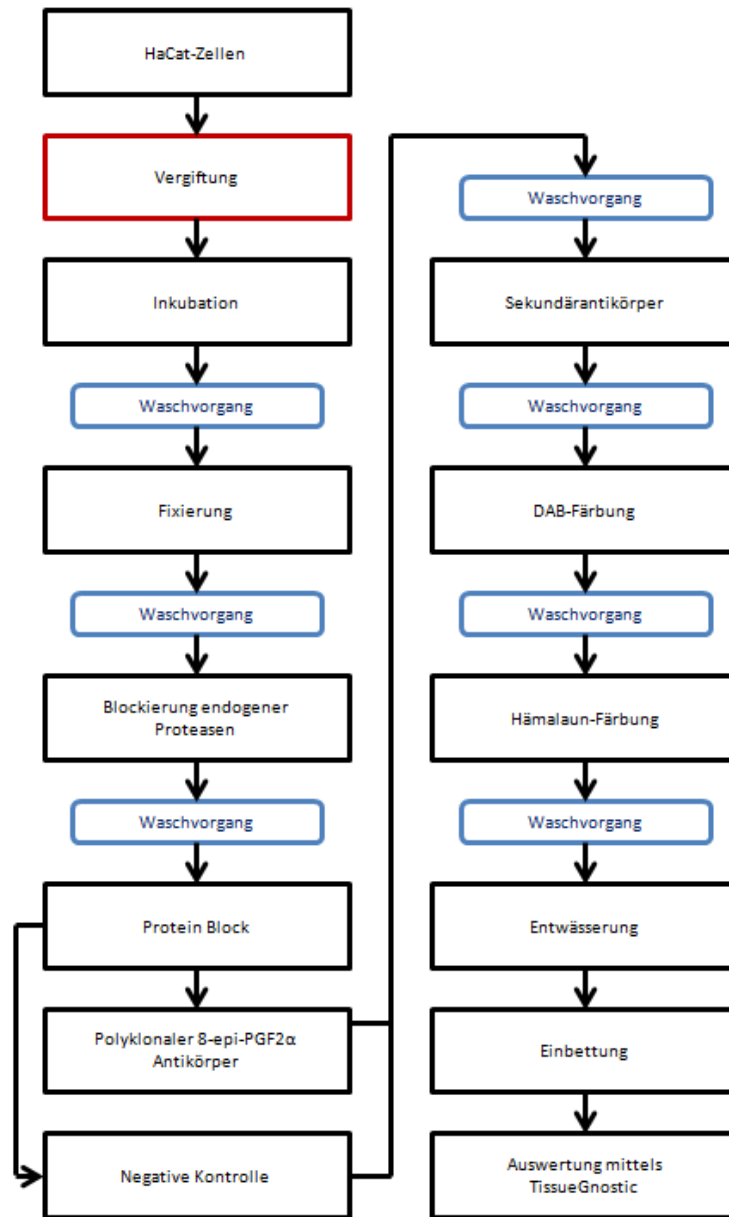


Abbildung 3.1: Graphischer Überblick der immunzytochemischen Versuchsdurchführung

In Abbildung 3.1 ist eine Übersicht der einzelnen Schritte im Rahmen der immunzytochemischen Versuchsdurchführung dargestellt. Zum Zeitpunkt der Passage 80 wurden die HaCaT-Zellen isoliert und auf zwei mit Deckgläschen bestückte 24-Well Platten zu 120.000 Zellen pro Well ausgesät. Nach vollständiger Zelladhäsion erfolgte eine Exposition der Zellen mit 100 μ M, 300 μ M und

1000 μM S-Lost (siehe Kapitel 3.2.4). Neben der S-Lost-Exposition kam auch H_2O_2 (Wasserstoffperoxid) in einer 0,1 % Konzentration zum Einsatz. Hierfür wurde H_2O_2 (30 % in H_2O) in einem Konzentrationsverhältnis von 1:30 mit Hilfe von PBS auf eine 1 %ige Lösung verdünnt. Diese wurde in einem weiteren 1:10 Verdünnungsschritt mit PBS auf die gewünschte Endkonzentration von 0,1 % gebracht. Zudem wurde eine Ethanol-Kontrolle angelegt, die bei einem gleichen Konzentrationsverhältnis wie die der 1000 μM S-Lost-Kondition, anstatt des S-Losts mit Ethanol zusammengesetzt wurde. Die Wells, die als Kontrolle und negative Kontrolle geführt wurden, erhielten einen Mediumwechsel. Nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO_2 fand ein zweimaliges Waschen mit PBS und eine anschließende Fixierung mittels PFA 4 % in PBS für 20 Minuten bei 4 °C statt. Der Fixierungsschritt ermöglichte an dieser Stelle, die Zellen in ihrem natürlichen, momentanen Zustand zu erhalten und dabei die Moleküleigenschaften, Färbbarkeit, Antigenität und Enzymaktivitäten nicht zu verändern.⁷² Bevor eine Lagerung über Nacht bei 4 °C möglich war, wurde die Platte von der Fixierungslösung befreit und erneut zweimal mit PBS gewaschen. Beim dritten Waschdurchgang verblieben 300 μl PBS pro Well. Am darauffolgenden Tag wurde mit dem Tris-Puffer (Tris- (hydroxymethyl-) aminomethan), der eine gute Pufferkapazität zwischen pH 7,2 und 9,0 aufweist, ein dreimaliger Waschvorgang à 5 Minuten durchgeführt. Im Anschluss erfolgte zur Permeabilisierung der fixierten Zellmembranen für 10 Minuten bei 4 °C eine Gabe von in destilliertem Wasser (ultrapure water) gelöstem 0,3 % Triton X-100. Es vermindert hierbei die Oberflächenspannung, sodass die Reagenzien das Präparat gleichmäßiger bedecken und leichter eindringen können.⁷² Nach einem erneuten Waschvorgang mit dem Tris-Puffer (3 x à 5 Minuten) fand eine Blockierung endogener Peroxidasen statt, um bei Hinzugabe von Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase = HRP) gekoppelten Sekundärantikörpern falsch-positive Signale auszuschließen. 0,3 %iges in Methanol gelöstes H_2O_2 sorgte als Substrat der Peroxidase bei einer Einwirkzeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur für eine vollständige Blockierung. Es wurde ein weiterer dreimaliger Waschvorgang à 5 Minuten mittels Tris-Puffer und ein Protein-Block für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Letzteres sorgte für die Detektion der Antigene. Direkt anschließend an den Blockierungsschritt erfolgte mit Ausnahme der negativen Kontrolle bei allen anderen Konditionen eine Gabe des polyklonalen 8-epi-PGF2 α Antikörpers (8-Isoprostano), gelöst in einem 1:240 Verhältnis in Antibody Diluent. Über Nacht bei 4 °C wurde dem Primärantikörper genug Zeit gegeben, um seine spezifischen Antigene zu binden. Danach war ein Waschschrift mit dem Tris-Puffer (3 x à 5 Minuten) notwendig, um den Peroxidase gekoppelten spezifischen Sekundärantikörper für 1,5 Stun-

den bei Raumtemperatur hinzugeben zu können. Da der Sekundärantikörper gegen die Spezies gerichtet sein musste, in der der Primärantikörper produziert wurde, wurde ImmPRESS™ Reagent Anti-Goat Ig bei dem polyklonalen Antikörper angewandt. Es folgten ein Waschschrift mit dem Tris-Puffer (3 x à 5 Minuten) und das Hinzufügen des Chromogens, das in Anwesenheit der Peroxidase zu einem farbigen Endprodukt oxidierte. Als Chromogen diente DAB (3-3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid), das einen dunkelbraunen unlöslichen Niederschlag bildete, der durch Zusatz von Schwermetallsalzen schwarz gefärbt wurde.⁷² DAB wies folgende Zusammensetzung auf:

Zu 5 ml destilliertem Wasser wurden 2 Tropfen Buffer Stock Solution, 4 Tropfen DAB Stock Solution, 2 Tropfen Hydrogen Peroxide Solution und für eine grau-schwarze Färbung 2 Tropfen Nickel Solution hinzugegeben. Nach jeder einzelnen Substanzgabe erfolgte ein gutes Durchmischen mit Hilfe des Vortex-Gerätes. Nach einer Inkubationszeit von 2 - 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Platte mit destilliertem Wasser für 5 Minuten gewaschen und mit Hämalalaun nach Mayer progressiv gefärbt. Diese sehr selektive, starke, blaue Kernfärbung diente bei einer Einwirkzeit von 2 - 4 Minuten als Kontrastfärbung zur DAB Färbung.⁷² Auf diesen Schritt folgten eine zweimalige Waschung à 5 Minuten mit Leitungswasser und eine viermalige Waschung der Platte mit destilliertem Wasser à 5 Minuten. Im Anschluss wurden die einzelnen Deckgläschen schrittweise in einer Alkoholreihe mit aufsteigender Konzentration (50 - 80 - 96 - 100 % absolutes Ethanol) entwässert, um hierbei Zerreißen und Schrumpfungen der Präparate möglichst zu vermeiden. Anschließend wurden die Deckgläschen in das Intermedium Xylol überführt, das sich sowohl mit dem absoluten Ethanol, als auch mit dem Einbettmittel Entellan mischen lässt. Als Lösungsmittel für das Einbettmittel Entellan diente Xylol an dieser Stelle dem Entfernen des Alkohols aus den Präparaten und dem Eindecken der Präparate auf den Objektträgern.⁷² Die Auswertung der insgesamt dreimalig durchgeführten Versuchsreihe erfolgte jeweils mithilfe des automatisierten Systems TissueGnostic.

3.2.6 8-Isoprostane ELISA Kit der Firma Enzo

3.2.6.1 Hintergrund¹

Für den quantitativen Nachweis von 8-Isoprostan wurde der 8-Isoprostane (8-Iso-PGF₂α) ELISA Kit der Firma Enzo verwendet. Beim Kit handelt es sich um einen kompetitiven ELISA: Die 96-Well Platte ist mit Goat Anti-Rabbit-IgG beschichtet. Sowohl das freie 8-Isoprostan der Proben als auch das vom Hersteller vorgegebene 8-Isoprostan, welches an eine alkalische Phosphatase

gekoppelt ist, werden den Wells hinzugefügt. Durch die Zugabe des polyklonalen Anti-8-Isoprostan Rabbit Antikörpers treten das freie und das enzym-gekoppelte 8-Isoprostan in Konkurrenz um die freien Bindungsstellen. Mithilfe der Substratzugabe P-Nitrophenyl Phosphat läuft eine enzymatische Reaktion ab, deren Produkt umgekehrt proportional zur freien 8-Isoprostan-Konzentration ist.

3.2.6.2 Probenvorbereitung und Durchführung

Zum Zeitpunkt der Passage 3 bzw. 4 erfolgte die Exposition der NHEK unter folgenden Konditionen: Kontrolle, EtOH, 30 μ M S-Lost, 100 μ M S-Lost, 300 μ M S-Lost und 1000 μ M S-Lost. Es erfolgte kein Waschschrift, sodass die Exposition nicht vorzeitig beendet wurde. Zudem wurden keine Proteinbestimmung sowie Probenaufreinigung durchgeführt. Bei der Herstellung der Reagenzien sowie bei der Durchführung des ELISAs wurden die Herstellerangaben der Firma Enzo befolgt. Das durch die alkalische Phosphatase gebildete Produkt wurde optisch bei einer Wellenlänge von 405 nm mittels eines Mikroplattenlesers bestimmt. Der Versuch wurde insgesamt dreimalig durchgeführt.

3.2.7 8-Isoprostane ELISA Kit der Firma Cayman

3.2.7.1 Hintergrund³

Darauf folgend wurde der 8-Isoprostane ELISA Kit der Firma Cayman durchgeführt. Diesem Kit liegt folgender Mechanismus zugrunde: 8-Isoprostan und ein vom Kit vorgegebenes 8-Isoprostan-Acetylcholinesterase Konjugat (8-Isoprostan-AChE) konkurrieren um eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen eines 8-Isoprostan spezifischen Antiserums. Die Konzentration der 8-Isoprostan-AChE ist hierbei konstant und die des 8-Isoprostans variabel. Es gilt: Die Menge von 8-Isoprostan-AChE verhält sich umgekehrt proportional zur 8-Isoprostan-Konzentration. Die mit Mouse Anti-Rabbit IgG vorbeschichtete 96-Well Platte geht eine Bindung mit dem 8-Isoprostan Antiserum Komplex ein. Zur Entfernung aller ungebundenen Reagenzien erfolgt daran anschließend ein Waschschrift. Um indirekt auf die 8-Isoprostan-Menge schließen zu können, ist eine Quantifizierung der 8-Isoprostan-AChE über die Messung seiner AChE-Aktivität mittels des Ellman's Reagenzes erforderlich. Dieses besteht sowohl aus Acetylcholin, dem Substrat für die Acetylcholinesterase, als auch aus 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid). Die durch die Acetylcholinesterase hervorgerufene Hydrolyse von Acetylthiocholin, lässt zunächst Thiocholin entstehen, das eine nicht enzymatische Reaktion mit 5,5-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid) eingeht und 5-thio-2-nitrobenzoic acid entstehen lässt. Dieses Endprodukt weist eine starke Absorption bei 412 nm und einen deutlichen gelben Farbton auf.

Die spektrophotometrisch bestimmte Farbintensität ist hierbei proportional zur 8-Isoprostan-AChE Menge, die wiederum eine umgekehrte Proportionalität zur freien 8-Isoprostan-Menge aufweist:

$$\text{Absorption} \sim [\text{8-Isoprostan-AChE}] \sim 1/[\text{8-Isoprostan}]$$

3.2.7.2 Probenvorbereitung und Durchführung

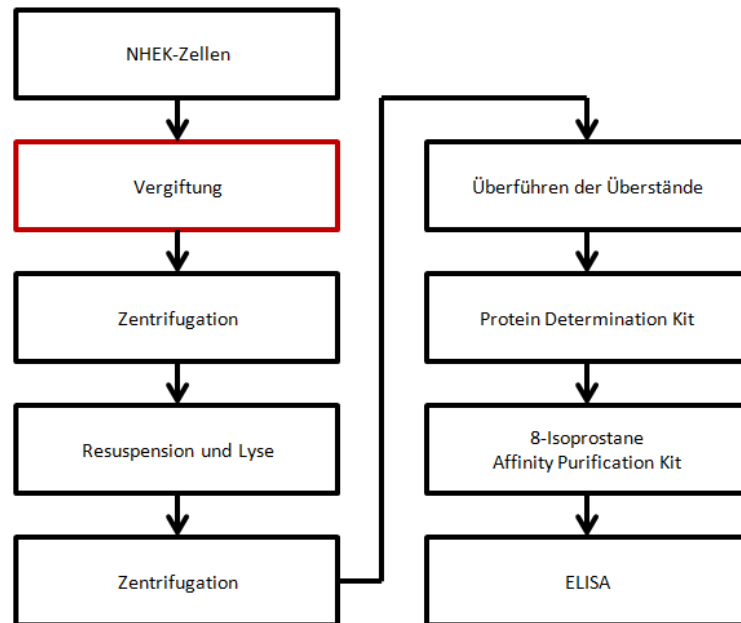


Abbildung 3.2: Graphischer Überblick der Vorbereitungsschritte für den ELISA

Der Abbildung 3.2 können die einzelnen Schritte bis zur Durchführung des ELISAs entnommen werden. Die in Kultur genommenen primären Keratinozyten wurden zum Zeitpunkt der Passage 4 auf 20 x 25 cm² große Kulturflaschen à 100.000 Zellen gesplittet. Bei einer Konfluenz von 80 % erfolgte die Exposition der Kulturflaschen unter folgenden 4 Konditionen: Kontrolle, EtOH-Kontrolle, 100 µM S-Lost und 300 µM S-Lost. Da jede Kondition wiederum unter 5 Inkubationszeiten (30 Minuten, 1 Stunde, 3 Stunden, 6 Stunden, 24 Stunden) geführt wurde, ergaben sich 20 erforderliche Proben. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde der Überstand verworfen und es erfolgte ein Ablösen der primären Keratinozyten. Das in einem 50 ml Zellkulturrohrchen abzentrifugierte Zellpellet wurde jeweils in 2 ml Lyse Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurden 1 mM EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure) und 0,005 % BHT (Butylhydroxytoluol) hinzugefügt. Der angesetzte Lyse-Puffer wurde auf 15 ml Zellrohrchen überführt

und bei -20 °C gelagert. Neben der chemischen Lyse mittels des Puffers erfolgte auch eine mechanische Lysierung der Zellen. Diese wurde durch eine dreimalige Durchführung eines Flüssigstickstoff-Ultraschall-Zyklus erreicht. Hierzu wurden die im Lyse-Puffer resuspendierten Zellen in Flüssigstickstoff Schock gefroren, um anschließend dem Ultraschall dreifach à 5 Sekunden ausgesetzt zu sein. Nach dem dritten Zyklus wurden die Proben bei 5000 rcf für 20 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden nach erfolgter Zentrifugation jeweils auf ein 50 ml Zellkulturröhrchen überführt und wurden anschließend bei -80 °C gelagert. Bevor der ELISA durchgeführt werden konnte, waren sowohl die Bestimmung des Proteingehaltes als auch die Aufreinigung der Proben notwendig.

3.2.7.2.1 Protein Determination Kit: Bestimmung des absoluten Proteingehalts⁸⁶

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Protein Determination Kit von Cayman bestimmt. Die Durchführung des Assays sowie die Vorbereitung der hierfür erforderlichen Reagenzien und Standards erfolgten nach den vorgegebenen Herstellerangaben.

Nach der Vorbereitung der Reagenzien und Standards wurde die High-Binding 96-Well Platte mit den entsprechenden Substanzen plattiert: Zunächst wurden 100 µl des jeweiligen Standards und 100 µl der mit destilliertem Wasser 1:10 verdünnten Proben pro Well überführt. Die Standardreihe wurde auf der Platte doppelt, die 20 Proben dreifach aufgetragen. Insgesamt waren hiermit 76 Wells in Gebrauch. Anschließend erfolgte die Gabe von 100 µl des bereits vorbereiteten Assay Reagenzes auf alle Standard- und Probenwells. Nach einer Inkubationszeit der Platte von 5 Minuten bei Raumtemperatur, erfolgte mittels des Mikroplattenlesers die Absorptionsmessung bei 595 nm.

3.2.7.2.2 8-Isoprostane Affinity Purification Kit: Probenaufreinigung²

Abhängig von der entsprechenden Probe liegt 8-Isoprostan zu einem gewissen Prozentsatz als veresterte Form vor. Da bei einer Messung von 8-Isoprostan nur die freie Form detektiert werden kann, muss für eine absolute 8-Isoprostan Erfassung eine Hydrolyse aller 20 Proben noch vor der Aufreinigung durchgeführt werden. Entsprechend dem Lysatvolumen von 2 ml wurde jeder Probe 15 %iges Kaliumhydroxid zugeführt und anschließend für 60 Minuten bei 40 °C inkubiert. Zur Neutralisierung der Proben wurde 1 M Phosphat bei einem pH-Wert von 6,5 - 7,5 als sechsfaches Volumen des ursprünglichen Probevolumens von 2 ml den einzelnen Proben hinzugefügt. Danach erfolgt bei 1100 rcf

für 3 Minuten ein Zentrifugieren der Proben, deren Überstand anschließend auf einen pH-Wert von 6,5 - 7,5 getestet wurde und für die Aufreinigung verwendet werden konnte. Die für den 8-Isoprostane Affinity Purification Kit notwendigen Reagenzien wurden laut Herstellerangaben hergestellt. Der Hydrolyse folgte die Aufreinigung der Proben mittels der 8-Isoprostane Affinity Columns. Die einzelnen Schritte der Aufreinigung erfolgten laut Herstellerangaben.

3.2.7.2.3 Bestimmung des absoluten 8-Isoprostans

Nach der Proteinbestimmung, die der Korrektur an die entsprechend vorliegende 8-Isoprostan-Konzentration diene, sowie der Probenaufreinigung, konnte der 8-Isoprostan ELISA Kit durchgeführt werden. Die hierfür erforderlichen Pufferlösungen und Reagenzien sowie der Assay wurden laut Herstellerangaben vorbereitet und angewendet. Die Absorption der Proben wurde mittels des Mikroplattenlesers bei einer Wellenlänge von 412 nm ausgelesen. Alle oben genannten Schritte wurden insgesamt dreimal durchgeführt.

3.2.8 ROS live cell imaging (CellROX®)

3.2.8.1 Hintergrund¹⁶

Unter „Live-Cell-Imaging“ wird die Untersuchung lebender Zellen mittels eines Fluoreszenzplattenlesers bzw. Fluoreszenzmikroskops verstanden, mit der Einblicke in die fundamentalen zellulären Prozesse und Gewebefunktionen erhalten werden können. Die CellROX® Reagenzien dienen als fluorogene, zell-durchlässige Substanzen dem Nachweis reaktiver Sauerstoffspezies in lebenden Zellen. Zum Einen wurde der DNA-Farbstoff CellROX® Green, dessen Signal vorzugsweise im Nukleus und in den Mitochondrien lokalisiert ist, zum Anderen der Farbstoff CellROX® Deep Red verwendet, dessen Signal im Zytoplasma zu finden ist. Beide Farbstoffe sind dabei photostabil.

3.2.8.2 Probenvorbereitung und Durchführung

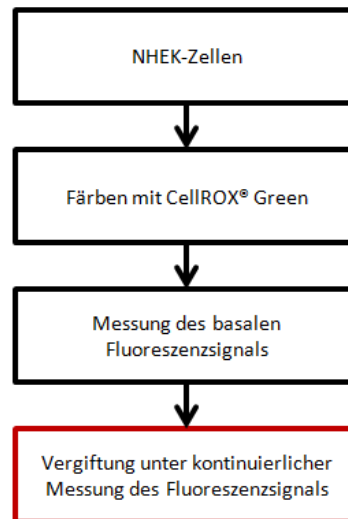


Abbildung 3.3: Graphischer Überblick der Versuchsschritte vor Durchführung des Live Cell Imagings

Der Abbildung 3.3 können die einzelnen Schritte bis zur Durchführung des Live Cell Imagings entnommen werden. Eine 25 cm² große Kulturf flasche mit angesetzten NHEK-Zellen wurde für 15 min mit dem Fluoreszenzfarbstoff CellROX® Green in einer Endkonzentration von 5 µM gefärbt. Danach wurden die Zellen abtrypsiniert und im Anschluss mit einem Neutralisator behandelt, um das Trypsin abzustoppen. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1,8 ml Medium aufgenommen und auf 8 Wells à 200 µl aufgeteilt. Das basale Fluoreszenzsignal wurde mithilfe des Fluoreszenzmikroplattenlesers über 60 Sekunden gemessen. Danach wurden mit einem automatisierten Injektionssystem je 10 µl Medium oder S-Lost in einer Endkonzentration von 1000 µM injiziert und die Fluoreszenz dabei kontinuierlich gemessen. Der Versuchsansatz wurde viermalig durchgeführt.

In einem weiteren Versuchsansatz erfolgte die Auswertung der Fluoreszenzintensitäten anhand einer mikroskopischen Untersuchung S-Lost exponierter Zellen, eine Übersicht des Versuchablaufes ist der Abbildung 3.4, Seite 33 zu entnehmen.

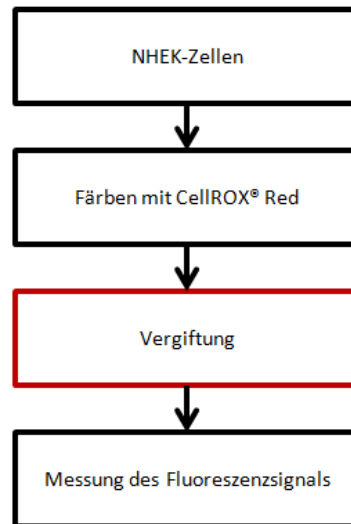


Abbildung 3.4: Graphischer Überblick des ROS-Versuches mit Vergiftung der Zellen nach Färbung mit CellROX® Red

Zum Zeitpunkt der Passage 3 wurden die primären Keratinozyten auf eine 4-Kompartiment-Zellkulturschale à 100.000 Zellen gesplittet. Bei einer Zelldichte von circa 70-80% erfolgte die Zugabe des Reagenz: Hierfür wurde zunächst das alte Medium in den 4 Kammern verworfen und durch 500 μ l vortemperiertes Medium pro Kammer ersetzt. Um bei dem vorgelegten Volumen von 500 μ l eine Endkonzentration des Farbstoffes von 5 μ M zu erreichen, wurde pro Kammer 1 μ l des Farbstoffes CellROX® Deep Red hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C erfolgte die Zellexposition: Zum Einen wurden die Zellen mit 500 μ l einer 300 μ M S-Lost-Lösung vergiftet, zum Anderen wurden dazu äquivalente Ethanol Kontrollen mit 500 μ l in Medium gelöstem Ethanol angelegt. Nach einer erneuten Inkubation von 30 Minuten wurde ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS durchgeführt. Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter Inkubationsbedingungen bei 37 °C und Wasserdampfathmosphäre an einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop bei einer Anregungswellenlänge/Emissionswellenlänge von 633/693 nm.

Um nähere Kenntnisse über die ROS-Freisetzungskinetik zu erhalten, erfolgten in 3 weiteren Versuchen Einzelmessungen über Zeiträume von bis zu 48 Stunden. Ein Überblick lässt sich in Abbildung 3.5, Seite 34 finden.

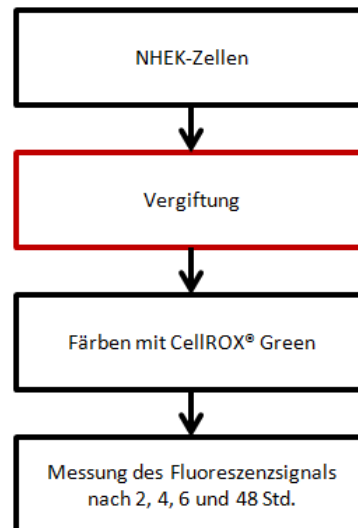


Abbildung 3.5: Graphischer Überblick des ROS-Versuches mit Vergiftung der Zellen vor Färbung mit CellROX® Green

Zum Zeitpunkt der Passage 4 wurden die primären Keratinozyten bei einer Zelldichte von 20.000 Zellen pro Well ausgesät. Am Folgetag erfolgte die Exposition der Zellen unter verschiedenen S-Lost-Konzentrationen (30 μ M, 100 μ M, 300 μ M, 1000 μ M) und einer Ethanol Kontrolle über 1 Stunde. Daran anschließend erfolgte das Beladen der Zellen mit CellROX® Green mit einer Endkonzentration von 5 μ M für 30 Minuten. Ein dreimaliger Waschvorgang mit PBS schloss sich daran an. Die Messung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroplattenleser bei einer Anregungswellenlänge/Emissionswellenlänge von 485/520 nm zu den Zeitpunkten 2 Stunden, 4 Stunden, 6 Stunden und 48 Stunden nach Exposition.

3.2.9 Oxidative Stress Array

3.2.9.1 Hintergrund^{48,87}

Um die Gen-Expressionsänderung von ROS-Stressproteinen zu untersuchen, wurde ein Oxidativer Stress Array durchgeführt. Grundlage des Arrays ist zunächst die Isolierung der RNA S-Lost-exponierter Zellen. Mithilfe einer reversen Transkriptase wird dann eine einzelsträngige, zur RNA komplementäre, DNA (cDNA) erstellt. Die Proben werden auf eine Gen-Array-Platte aufgetragen, auf welcher sich komplementäre Einzelstrang-DNA zu spezifischen ROS-assoziierten Genabschnitten befindet. An diese lagert sich die hergestellte cDNA an, welche anschließend durch PCR amplifiziert wird. Diese umfasst in unserem Aufbau 40 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Schritten, die bei unterschiedlicher Tem-

peratur ablaufen: Im Rahmen der Denaturierung wird die Matrizen-DNA durch Erhitzen auf etwa 95 °C in Einzelstränge aufgetrennt. In einem zweiten Schritt, dem sogenannten Annealing lagern sich zwei verschiedene Primer an den jeweiligen komplementären Bereich des DNA-Einzelstrangs an. Die Temperatur für diese Hybridisierung der Primer lag in unserem Versuchsaufbau bei 60 °C. Im letzten Schritt verlängert eine thermostabile DNA-Polymerase die Primer mithilfe von dNTPs bei ca. 60 °C. Die Quantifizierung der DNA-Abschnitte erfolgt im Rahmen einer Real-Time-PCR mithilfe eines fluoreszierenden Farbstoffes, hier SYBR® Green, der unspezifisch an Doppelstrang-DNA bindet.

3.2.9.2 Probenvorbereitung und Durchführung

Im Rahmen der Probenvorbereitung erfolgte die Exposition der primären Keratinozyten zum Zeitpunkt der Passage 4 in gesonderten Gruppen mit 30 µM, 100 µM und 300 µM S-Lost. Des Weiteren erfolgte das Anlegen einer Ethanol-Kontrollgruppe. Für jede Expositionsgruppe wurden folgende Schritte durchgeführt: Nach 6 Stunden erfolgte die Isolation der RNA aus den Zellen, die mithilfe des RNeasy® Mini Kits durchgeführt wurde. Als Grundlage diente das Protokoll „Purification of Total RNA from Animal Cells using Spin Technology“. Mithilfe des NanoDrop wurde die gewonnene RNA-Konzentration gemessen. Im Anschluss erfolgte die Umschreibung der 500 ng RNA in cDNA mithilfe des RT² First Strand Kits. In einem nächsten Schritt wurden die cDNA Proben auf die PCR laut Herstellerangaben mithilfe des RT² SYBR® Green ROX qPCR Mastermixes unter Zuhilfenahme des Tecan Roboters vorbereitet. Die Amplifikation der cDNA mittels Real-Time-PCR erfolgte mit dem Mastercycler. Die vom Gerät zur Verfügung gestellten C_T-Werte wurden in eine Excel-Datei übertragen. Die Auswertung erfolgte mithilfe einer Web-basierten Software von SABiosciences.

Ein C_T-Wert entsprach dem jeweiligen Zyklus, bei dem die Fluoreszenz den Schwellenwert des Hintergrundwertes exponentiell überschritt.

3.2.10 Western Blot

3.2.10.1 Hintergrund^{48,61,87}

Der Western Blot stellt ein Verfahren zum Nachweis von Proteinen in einem Proteingemisch dar. Im ersten Schritt wird das Proteingemisch mittels einer Gelelektrophorese in einer Trägermatrix, hier SDS Page, entsprechend der Protein-Größe in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Die getrennten Proteinbanden werden danach für den Western Blot aus dem Gel auf eine feste Trägermembran (Nitrozellulose, PVDF) transferiert. Dazu wird das Gel mit

den Polypeptidbanden in eine spezielle Elektrophoresekammer gegeben, in der sich auch die Membran befindet. An dieser Stelle ist es möglich, eventuell vorhandenes SDS auszuwaschen, sodass die Proteine teilweise renaturieren und ihre Sekundär- und Tertiärstruktur partiell wiedererlangen. Durch das Anlegen einer elektrischen Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels, wandern die Proteinbanden aus dem Gel heraus und gelangen auf die Membran, an der sie gebunden werden. Die Proteine bleiben an der Membranoberfläche im Muster der elektrophoretischen Auftrennung haften und sind für die Antikörper-Bindung zur Detektion zugänglich. Dieser Vorgang wird Blotting genannt. Zur Detektion der Proteine werden zuerst primäre Antikörper eingesetzt, die spezifisch an der zugehörigen Proteinbande binden. Der Sekundärantikörper, welcher hier mit einem Farbstoff markiert ist, dient dem Nachweis des Primärantikörpers. Die Auswertung des Western Blots kann über verschiedene Imaging Systeme erfolgen, in dieser Arbeit wurde Lumineszenz verwendet.

3.2.10.2 Probenvorbereitung und Durchführung

Die Exposition der primären Keratinozyten erfolgte im Rahmen der Probenvorbereitung unter folgenden Konditionen: 30 μM , 100 μM , 300 μM S-Lost, sowie Ethanol als Kontrollgruppe. Nach 6 Stunden erfolgte mithilfe eines Triton X-100 Extraktionspuffers (100 $\mu\text{l}/10^6$ Zellen) die Zelllyse für 15 Minuten auf Eis zur Extraktion der Proteine. Hierfür wurde folgender Extraktionspuffer verwendet:

Tabelle 3.3: Extraktionspuffer

25 mM TRIS pH 7,5
50 mM NaCL
10 mM EDTA
1,5 % Triton X-100
cOmplete TM Mini Protease Inhibitor Cocktail (1 Tabl/10 ml)

Nach Überführung in ein Eppendorf-Gefäß und deren Homogenisierung, erfolgte das Aliquotieren der Extrakte, nachdem unlösliche Bestandteile abzentrifugiert wurden. Die Aufbewahrung erfolgte bei -20 °C. Im Anschluss wurden die Extrakte mit Protein Loading Buffer und DTT bei 99 °C für 5 Minuten gekocht. Es folgte das Auftragen auf ein NuPage Gel, um die Elektrophorese bei 200 V und 50 mA für 70 Minuten durchzuführen. Anschließend fand der Transfer bei 100 V

und 300 mA für 90 Minuten auf die PVDF-Membran statt. Danach erfolgte ein 30 minütiger Blockierungsschritt mit TBS Blocking Solution. Über Nacht konnte eine Inkubation mit Primärantikörpern gegen CAT (Catalase), SOD1 (Superoxiddismutase), TXN (Thioredoxin), Actin, HO-1 (Hämoxygenase 1), GCLC (Glutamate cysteine ligase catalytic subunit) und Cox 2 (Cyclooxygenase 2) durchgeführt werden. Darauf schlossen sich 3 Waschzyklen mit PBS/0,1 % Tween sowie eine Inkubation über 60 Minuten mit entsprechenden Sekundärantikörpern, wie Anti-Rabbit IRDye® 800CW und Anti-Mouse IRDye® 800CW an. Die Auswertung erfolgte mit dem LI-COR® Odyssey® Classic.

3.2.11 ROS-Scavenger

3.2.11.1 Hintergrund

Der hier gewählte Ansatz mit spezifischen Scavengern wie N-Acetylcystein und Gluthation diene der Überprüfung, ob durch Einsatz antioxidativer Substanzen die 8-Isoprostan-Bildung nach S-Lost-Exposition vermindert werden kann. Hierbei wurde zwischen einem prä- und postexpositionellen Einsatz der Scavenger differenziert. Die Wirkweise von Antioxidantien wird im Kapitel 2.4.5 erläutert.

3.2.11.2 Probenvorbereitung und Durchführung

Die NHEK-Zellen befanden sich auch hier zum Zeitpunkt der Passage 3 bzw. 4. Hinsichtlich der Intervention mit ROS-Scavengern wurden zwei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt: Zum Einen Exposition der Zellen mit EtOH, 100 μ M und 300 μ M S-Lost 15 Minuten nach der Intervention mit 5 mM N-Acetylcystein (NAC), Glutathion (GSH) bzw. PBS. Zum Anderen Intervention mit 5 mM NAC, GSH bzw. PBS eine Stunde nach der Exposition mit EtOH, 100 μ M und 300 μ M S-Lost. Eine 8-Isoprostan-Bildung wurde 3 Tage nach der entsprechenden, oben genannten Exposition mittels ELISA (siehe Kapitel 3.2.6) nachgewiesen. Insgesamt wurde die Versuchsreihe viermalig durchgeführt.

4 Ergebnisse & Diskussion

Die molekulare Toxikologie von S-Lost ist bis heute nicht vollständig verstanden. In einigen Studien wurde eine S-Lost-induzierte Bildung von freien Radikalen als mögliche Ursache postuliert.^{75,84,102} Es fehlen jedoch systematische Untersuchungen, ob S-Lost tatsächlich zu einer Erhöhung von Radikalenspezies führt. Ob S-Lost – insbesondere in der Frühphase nach Exposition – zu einer ROS-Bildung führt, ist Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Oxidativer Stress ist dabei durch eine über das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen charakterisiert. „Reaktive Sauerstoffverbindungen“, auch als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) bezeichnet, sind keine singuläre chemische Entität. Vielmehr werden unter diesem Begriff eine Vielzahl chemischer Radikale summiert wie das Superoxid-Anion ($O_2^{\bullet-}$), das Hydroxyl-Radikal (OH^{\bullet}), oder Wasserstoffperoxid (H_2O_2), um beispielhaft wichtige Vertreter zu benennen. Aufgrund der hohen Reaktivität der Radikale und der damit verbundenen extrem kurzen Halbwertszeit, die teilweise im Sekundenbereich liegt, gilt es als schwierig, oxidativen Stress unmittelbar nachzuweisen. Die hohe Reaktivität ermöglicht es, dass ROS eine Vielzahl biogener Makromoleküle wie DNA, Lipide, Proteine und Kohlenhydrate oxidieren. Solche Radikalenreaktionsprodukte können als Biomarker und somit als indirekten Nachweis für ROS herangezogen werden. Ferner erlaubt der Nachweis geeigneter Biomarker eine Quantifizierung von oxidativem Stress.⁴⁵

Der Nachweis von 8-Isoprostan (8-iso-Prostaglandin $F2\alpha$, $iPF_{2\alpha}$), eine prostaglandinähnliche Verbindung, die durch die Peroxidation von Arachidonsäure entsteht, gilt aufgrund seiner biochemischen Stabilität als ein zuverlässiger ROS-Biomarker, der bereits in zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien genutzt wurde.^{69,79} Erhöhte Pegel von 8-Isoprostan konnten im Plasma und Urin von Menschen in pathophysiologischen Konzentrationen bei vermehrtem oxidativem Stress, wie z.B. bei Rauchern, Paracetamolintoxikation und Sklerodermie nachgewiesen werden.^{67,68,70,79,95,113}

Eine biologische Aktivität zeigt sich bei 8-Isoprostan, dem sowohl eine Funktion als pulmonaler und renaler Vasokonstriktor, als auch eine ursächliche Mediatorrolle bezüglich des hepatorenenalen Syndroms und der pulmonalen Sauerstofftoxizität nachgesagt werden.^{67,70} Da 8-Isoprostan eine Indikatorfunktion für oxidativen Stress sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufweist, ist im Hinblick auf

den Nachweis reaktiver oxidativer Sauerstoffspezies nach S-Lost-Exposition eine Quantifizierung von 8-Isoprostan im Plasma, Urin und anderen Probematerialien von Bedeutung.^{67,68,70,95}

Erstaunlicherweise wurden nur wenige Studien veröffentlicht, die sich mit der detaillierten Rolle von ROS, insbesondere in der Frühphase einer S-Lost-Exposition in humanen Keratinozyten, auseinandersetzen. Dies ist Gegenstand der vorgelegten Arbeit. Anhand der Ergebnisse in den folgenden Kapiteln wird zunächst auf den Nachweis von oxidativem Stress nach S-Lost-Exposition eingegangen, um im Anschluss die zellbiologischen Wirkungen auf Gen- und Proteinebene zu erläutern und zu diskutieren.

4.1 Nachweis von 8-Isoprostan

Aufgrund der biochemischen Stabilität wurden zunächst mit Hilfe des Mikropplattenlesers die 8-Isoprostan-Spiegel drei Tage nach S-Lost-Exposition mittels ELISA bestimmt. Wie in Abbildung 4.1, Seite 40 gezeigt, ist eine Zunahme der 8-Isoprostan-Konzentration im Zellüberstand nach Exposition der humanen Keratinozyten (NHEK) mit EtOH und S-Lost in aufsteigenden Dosierungen (30, 100, 300 μM) grundsätzlich festzustellen, während in der Kontrollgruppe mittels ELISA keine detektierbaren 8-Isoprostan-Spiegel nachgewiesen werden konnten. Dabei folgen die Ergebnisse einer Dosis-Wirkungsbeziehung mit einem Maximum bei 300 μM S-Lost. In der 1000 μM S-Lost-Gruppe ist ein Rückgang der 8-Isoprostan-Bildung zu erkennen. Dieser ist mit einem hohen Zelluntergang zu erklären, da die $\text{LC}_{50(24h)}$ bei Keratinozyten im Bereich von 150 μM zu finden ist.¹¹ Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Balszuweit *et al.* gemacht, die eine Abnahme der Zytokin-Freisetzung bei höheren S-Lost-Konzentrationen detektieren konnten.^{10,11}

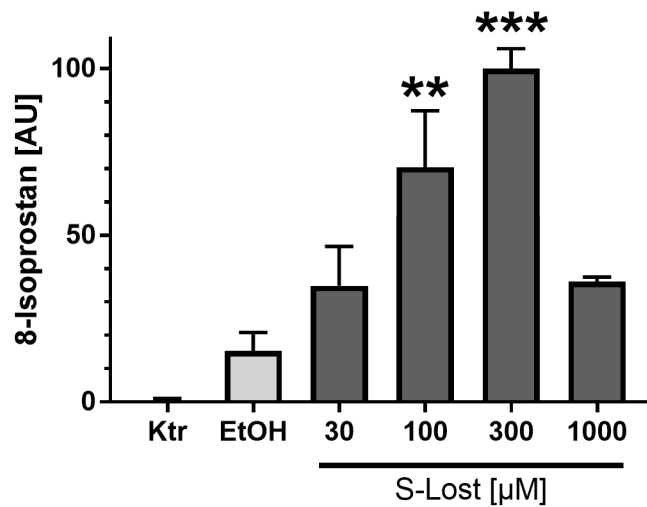


Abbildung 4.1: 8-Isoprostan-Bildung 3 d nach S-Lost-Exposition in NHEK. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus 3 biologischen Versuchen mit jeweils 3 technischen Replikaten ($n = 3$). Statistische Unterschiede zwischen den S-Lost-Gruppen und der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) wurden mittels one-way ANOVA untersucht und markiert (** = $p < 0,01$, *** = $p < 0,001$). Fehlerbalken = SEM.

Diese Ergebnisse belegen, dass S-Lost grundsätzlich zu einer signifikanten Erhöhung von ROS-Reaktionsprodukten in NHEK führt.

In einem nächsten Schritt wurde die Kinetik der S-Lost-induzierten 8-Isoprostan-Bildung detaillierter untersucht. Dazu wurde ebenfalls ein ELISA verwendet. Als Untersuchungszeitpunkte wurden 30 min sowie 1, 3, 6 und 24 h gewählt. Als S-Lost-Konzentrationen wurden solche gewählt, die signifikante Ergebnisse in den Langzeit-ELISA Versuchen gezeigt hatten (100 und 300 μM). Ein exemplarisches Ergebnis ist in Abbildung 4.2, Seite 41 dargestellt. Bereits nach 30 Minuten ist eine erhöhte 8-Isoprostan-Bildung unter S-Lost feststellbar. Diese folgt überwiegend einer Dosis-Wirkungsbeziehung. Ein kontinuierlicher Signalanstieg mit einem Maximum bei 24 h ist erkennbar.

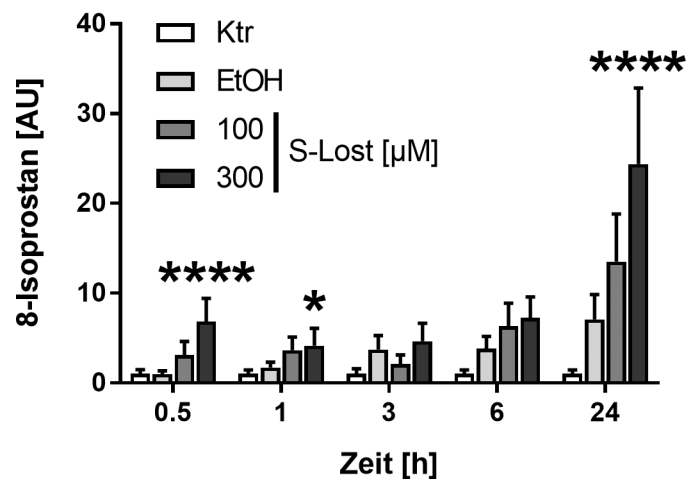


Abbildung 4.2: Kinetik der S-Lost-induzierten 8-Isoprostan-Bildung. Bereits 30 min nach S-Lost-Exposition ist eine erhöhte Bildung von ROS-Reaktionsprodukten erkennbar. Zum letzten Untersuchungszeitpunkt (24 h) sind die höchsten 8-Isoprostan-Spiegel detektierbar. Dargestellt sind die Kontroll-normierten Mittelwerte aus 3 technischen Replikaten pro Untersuchungszeitpunkt. Statistische Unterschiede zwischen den S-Lost-Gruppen und der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) wurden mittels one-way ANOVA untersucht und markiert (* = $p < 0,05$, **** = $p < 0,0001$). Fehlerbalken = SEM.

Die kinetischen Ergebnisse stehen im Einklang mit den zuvor erzielten Langzeitergebnissen und decken sich weiterhin mit den Ergebnissen von Steinritz *et al.*, die ebenfalls erhöhte ROS-Reaktionsprodukte mittels immunhistochemischer Färbungen nach S-Lost-Exposition in immortalisierten Keratinozyten nachweisen konnten.⁹⁶ Insgesamt wurden 3 biologische Versuche durchgeführt, die zum Teil große Schwankungen und nicht kongruente Daten erbrachten. Aufgrund von Lieferengpässen des verwendeten ELISA konnten die Versuche nicht wiederholt werden, sodass die Aussagekraft der vorgestellten Kinetikdaten als eingeschränkt betrachtet werden muss, wobei jedoch zumindest ein Trend abgeleitet werden kann.

Um die Ergebnisse der ELISA Untersuchungen zu verifizieren, wurde eine immunzytochemische Färbung von 8-Isoprostan 6 h nach S-Lost-Exposition

durchgeführt. Zur Objektivierung der Ergebnisse erfolgte eine automatisierte Signalvermessung mithilfe eines automatisierten Auswertesystems (Tissue-Gnostic). Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.3, Seite 43 dargestellt. In der nicht-exponierten Kontrollgruppe ist lediglich ein schwaches Signal detektierbar (Abb. 4.3 A), während in den S-Lost-exponierten Zellen (Abb. 4.3 B-D) ein deutliches, primär zytosolisches Signal erkennbar ist. Die Auswertung mittels Signal-Gating lässt ebenfalls eine konzentrationsabhängige Zunahme der Signalintensitäten deutlich werden. Ausnahme bildet hier lediglich die 300 μM S-Lost-Gruppe, die in der automatisierten Vermessung keine höheren Signalintensitäten als die Kontrollgruppe aufgewiesen hat. Ein technischer Fehler bei der Zellexposition oder bei der immunzytochemischen Färbung scheint hier die wahrscheinlichste Erklärung für diesen unerwarteten Befund zu sein. Zum Untersuchungszeitpunkt von 6 h zeigte die 1000 μM S-Lost-Gruppe die stärkste 8-Isoprostan-Bildung. Im Gegensatz zu den späteren Untersuchungszeitpunkten wie beispielsweise drei Tagen ist der Zellverlust zwar in den höheren Expositionsgruppen ebenfalls zu verzeichnen, erscheint zu diesem frühen Zeitpunkt jedoch vernachlässigbar zu sein. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Steinritz *et al.*, die in ihren Experimenten ebenfalls ein Maximum der Radikalenreaktionsprodukte nach 6 h finden konnten.⁹⁶

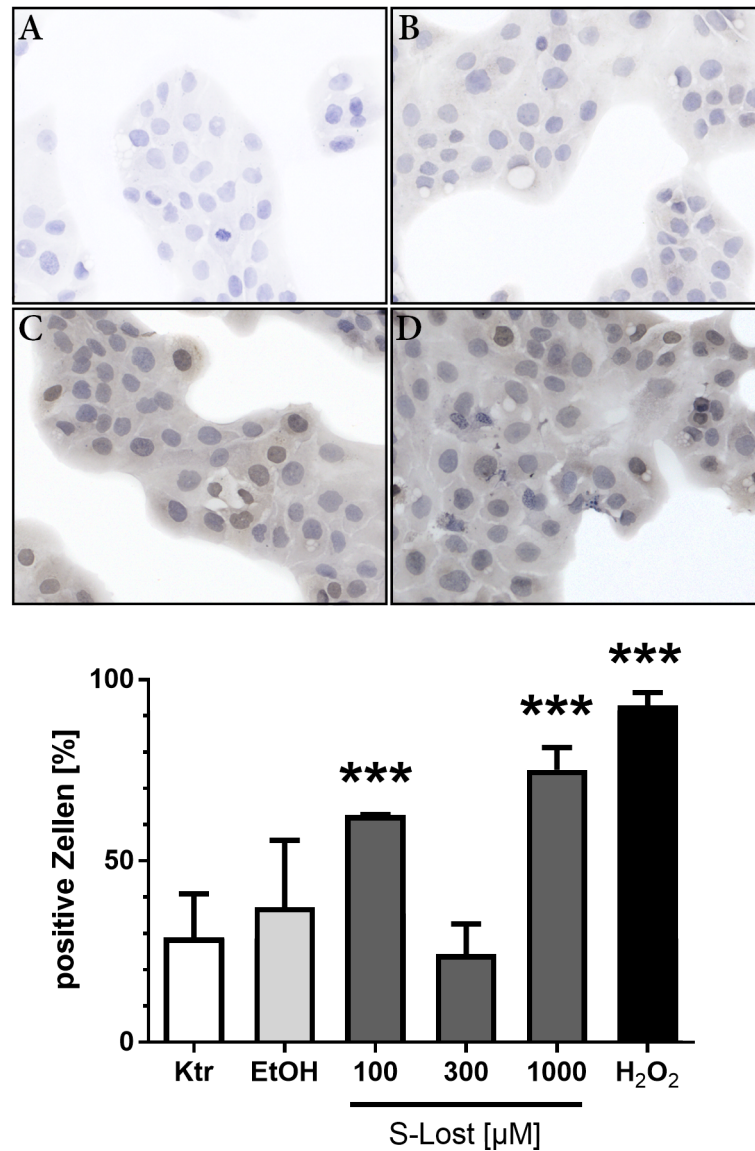


Abbildung 4.3: Immunzytochemischer 8-Isoprostan-Nachweis. Eine deutliches, vorwiegend zytosolisches Signal kann 6 h nach S-Lost-Exposition detektiert werden (C: 100 µM; D: 1000 µM S-Lost), während in den Kontrollgruppen (A: Medium-Kontrolle; B: EtOH-Kontrolle) kein, oder nur ein schwaches Signal gefunden werden kann. Die automatisierte Auswertung mittels TissueGnostic zeigten in der Kontrolle 28,9 % positive Zellen im Vergleich zu den S-Lost-Gruppen, die bei 100 µM S-Lost 62,6 % und bei 1000 µM S-Lost 75,1 % positive Zellen aufwiesen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller automatisiert erfassten Zellen aus 3 biologischen Versuchen (n = 3). Signifikante Signalerhöhungen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) wurden mittels one-way ANOVA untersucht und markiert (*** = p < 0,001). Fehlerbalken = SEM.

Grundsätzlich belegen die immunhistochemischen Färbungen die zuvor erzielten ELISA-Ergebnisse.

4.2 ROS live cell imaging

Die bisher durchgeführten Versuche konnten grundsätzlich eine S-Lost-induzierte ROS-Bildung belegen, jedoch erlaubten die eingesetzten Techniken keine Untersuchungen unmittelbar nach einer Exposition. Abhängig von der Sauerstoffradikalenbildung sowie des Zellmilieus beträgt die Lebensdauer eines radikalen Sauerstoffmoleküls wenige Nanosekunden bis Sekunden. Um eine höchstmögliche zeitliche Auflösung zu erhalten, wurden reaktive Sauerstoffspezies mittels Fluoreszenzfarbstoffen markiert und zeitlich aufgelöst dargestellt.¹¹² Jedoch ist die Versuchsdurchführung aufgrund der hohen Toxizität von S-Lost komplex und unterliegt hohen Sicherheitsanforderungen. Die Nutzung eines Fluoreszenzmikroplattenreaders, der in einem Sicherheitsabzug eingestellt und mit einem automatisierten Injektionssystem ausgestattet war, erlaubte die Online-Messung einer potenziellen frühen ROS-Freisetzung. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4, Seite 45 dargestellt. Nach Erfassung des basalen Fluoreszenzsignals über einen Zeitraum von 60 Sekunden erfolgte die Injektion von S-Lost in einer Endkonzentration von 1000 μM . Unmittelbar nach Exposition zeigte sich ein Fluoreszenzmaximum.

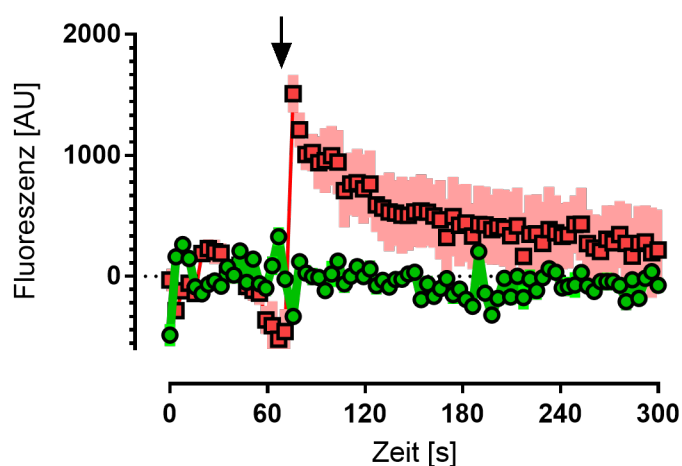


Abbildung 4.4: ROS-Detektion mittels Live-Cell-Imaging. Nach $1000\text{ }\mu\text{M}$ S-Lost-Exposition (schwarzer Pfeil) zeigt sich ein schneller Signalanstieg des Fluoreszenzsignals (rote Kurve). Dieses nimmt im Zeitverlauf ab, bleibt jedoch eindeutig gegenüber des basalen Signals (grüne Kurve) differenzierbar. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus 4 Versuchen.

Das Signal nahm im Verlauf zügig ab, unterschied sich zu jedem Beobachtungszeitpunkt aber von dem basalen Signal. Diesem Signalabfall könnten mehrere Ursachen zugrunde liegen. Ein häufiges Phänomen bei Fluoreszenzfarbstoffen ist das Ausbleichen des Farbstoffes im Zeitverlauf, vor allem bei repetitiven Anregungsvorgängen. Fluoreszenzfarbstoffe stellen zellfremde Verbindungen dar. Ein aktives Ausschleusen solcher Komponenten wird oftmals beobachtet, sodass die intrazelluläre Konzentration für etwaige Nachweisreaktionen signifikant abnehmen kann. Die Reaktion des Analyten mit den Detektormolekülen steht in Konkurrenz zu anderen chemischen Reaktionen. Falls die Interaktion zwischen Analyt und Detektormolekül nicht kovalenter Natur ist, wird sich ein Gleichgewicht zwischen den möglichen Reaktionen einstellen, wobei Reaktionen mit schneller Kinetik in der Regel bevorzugt ablaufen.

Als alternative Methode zur Mikroplattenreader-gestützten Auswertung der Fluoreszenzintensitäten wurde eine mikroskopische Untersuchung S-Lost-exponierter Zellen durchgeführt. Aufgrund der einzuhaltenden Sicherheitsvorschriften konnte jedoch keine Injektion von S-Lost am Mikroskoparbeitsplatz vorgenommen werden. Die Zellen wurden zuerst mit S-Lost in einem Sicher-

heitsabzug exponiert und nach 30 Minuten mikroskopisch untersucht. In dieser Zeit sollte S-Lost entweder mit Zielstrukturen reagiert haben oder nahezu vollständig hydrolysiert sein. Wie Abbildung 4.5 zu entnehmen ist, zeigen die vormals 300 μ M S-Lost-exponierten Zellen ein deutliches zytosolisches Fluoreszenzsignal des ROS-Farbstoffes CellROX[®] Deep Red (Abb. 4.5 B), womit eine ROS-Bildung ebenfalls belegt werden kann. Die Kontrollgruppe (Abb. 4.5 A) zeigt hingegen kein Signal.

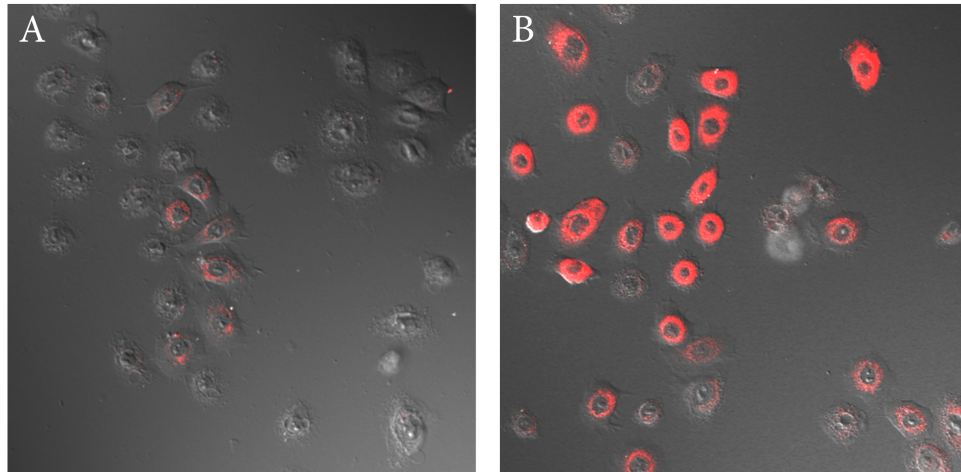


Abbildung 4.5: Mikroskopischer Nachweis einer S-Lost-induzierten ROS-Bildung. NHEK wurden mit dem ROS-Farbstoff CellROX[®] Deep Red beladen und im Anschluss mit 300 μ M S-Lost (B) oder EtOH (A) für 30 Minuten exponiert. Die mikroskopische Auswertung erfolgte unter Inkubationsbedingungen (37 °C, Wasserdampfatmosphäre) an einem Laser-Scanning-Mikroskop mit Restlichtverstärkung. Dargestellt sind Differentialinterferenzkontrastbilder, die mit den spezifischen Fluoreszenzsignalen (rot) in Überlagerung dargestellt sind. Während sich in der EtOH-Kontrollgruppe kein wesentliches Signal detektieren lässt, zeigen die 300 μ M exponierten Proben ein deutliches zytosolisches Fluoreszenzsignal.

Nachdem mittels Fluoreszenzfarbstoffen eine unmittelbare ROS-Freisetzung nach S-Lost-Exposition nachgewiesen werden konnte, wurden in weiteren Versuchen Einzelmessungen über einen Zeitraum von bis zu 48 h durchgeführt, um weitere Hinweise auf die ROS-Freisetzungskinetik zu erhalten. Hierzu wurden

die Keratinozyten mit unterschiedlichen S-Lost-Konzentrationen exponiert und mittels CellROX[®] beladen. Zu den jeweiligen Zeitpunkten ist dann mittels des Fluoreszenzplattenreaders die Fluoreszenz erfasst worden. Wie aus der Abbildung 4.6, Seite 48 zu entnehmen ist, konnte zu allen Untersuchungszeitpunkten eine gesteigerte ROS-Bildung detektiert werden. Diese war vor allem bei hohen S-Lost-Konzentrationen (1000 μM) deutlich zu verzeichnen. Bei niedrigeren Expositionsdosen ließen sich zwar tendenziell ebenfalls höhere ROS-Spiegel feststellen, die sich jedoch erst zum Untersuchungszeitpunkt von 48 h deutlich erhöht darstellten.

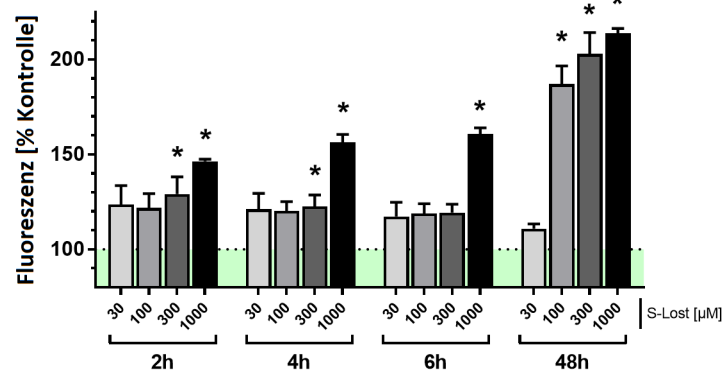


Abbildung 4.6: CellROX-basierter ROS-Nachweis im zeitlichen Verlauf. NHEK wurden mit unterschiedlichen S-Lost-Konzentrationen exponiert, mit CellROX® Green beladen und gewaschen. Messungen der Fluoreszenzintensitäten erfolgten im Zeitverlauf unter Nutzung eines Fluoreszenzplattenreaders. Vor allem unter hohen S-Lost-Konzentrationen (1000 µM) ist ein signifikanter ROS-Anstieg zu verzeichnen. Niedrigere Konzentrationen (100, 300 µM) bewirkten erst zum Untersuchungszeitpunkt 48 h einen deutlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals. Bei 30 µM S-Lost konnten in unseren Versuchen keine signifikant erhöhten ROS-Spiegel detektiert werden. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus 3 unabhängigen Versuchen. Die Normierung erfolgte auf das Fluoreszenzsignal der EtOH-Kontrolle (100%; grüner Bereich) zum jeweiligen Untersuchungszeitpunkt. Statistische Unterschiede zwischen den S-Lost-Gruppen und der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) wurden mittels one-way ANOVA untersucht und markiert (* = $p < 0,05$). Fehlerbalken = SEM.

Auch die mittels CellROX® durchgeführten Messungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten konnten eine S-Lost-induzierte ROS-Freisetzung belegen. In unseren Versuchen zeigten vor allem hohe S-Lost-Konzentrationen bereits zu frühen Zeitpunkten signifikant höhere ROS-Spiegel. Vermutlich sind hier antioxidative Abwehrmechanismen der Zellen bereits ausgeschöpft, sodass eine pathologische Erhöhung der ROS-Spiegel resultiert. Denkbar ist in diesem Zusammenhang

beispielsweise eine Glutathion-Depletion, wie sie auch für S-Lost typischerweise postuliert wird.^{52,84} Bei niedrigeren Konzentrationen scheinen antioxidative Mechanismen das erhöhte Aufkommen von ROS kompensieren zu können. Die mittels CellROX® und Fluoreszenzreader erzielten Ergebnisse stimmen mit den zuvor erzielten ELISA Ergebnissen überein, wobei die ROS-Detektion mittels Fluoreszenzfarbstoffen etwas weniger sensitiv zu sein scheint. Dies deckt sich mit Erfahrungen aus anderen Projekten. Bemerkenswerterweise konnten weder die Langzeit-ELISA Versuche, noch die CellROX®-Experimente einen langanhaltenden, signifikanten Anstieg der ROS-Spiegel bei einer Expositionskonzentration von 30 µM S-Lost zeigen. Anscheinend ist im Bereich um 30 µM S-Lost eine Art Schwellenkonzentration zu vermuten, ab der mit einem nachweisbaren Anstieg der ROS-Spiegel zu rechnen ist. Ob dieses tatsächlich zutrifft, oder ob lediglich der Anstieg der ROS-Spiegel unterhalb der methodischen Nachweisgrenzen der unterschiedlichen Assays liegt, kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet werden. Im Hinblick auf die wichtigen physiologischen Funktionen basaler ROS-Spiegel könnten bereits kleine Abweichungen zu zellulären Dysfunktionen führen.²⁹

4.3 Expressionsänderung von ROS-Stressproteinen

Die bisher erzielten Ergebnisse geben deutliche Hinweise, dass eine S-Lost-Exposition zu einem ROS-Stress in Keratinozyten führen kann. Dieser scheint sich bereits unmittelbar nach der Exposition zu manifestieren. In den folgenden initialen Versuchen wurden die Auswirkungen von S-Lost auf zelluläre ROS-Stressproteine untersucht. Da eine zellbiologische Reaktion in der Regel zu frühen Zeitpunkten zu erwarten ist, wurden eine Änderung der Genexpression von 84 relevanten Genen auf mRNA-Ebene 6 h nach S-Lost-Exposition mittels Array untersucht. Der eingesetzte Array berücksichtigte unter anderem Peroxidasen, Glutathionperoxidasen (GPx) und Peroxiredoxinen (TPx). Ebenfalls eingeschlossen waren Gene, die am Metabolismus reaktiver Sauerstoffspezies beteiligt sind. Darüber hinaus wurden ROS-sensitiv regulierte Gene und solche, die am Superoxid-Metabolismus beteiligt sind, wie Superoxid-Dismutasen (SOD), untersucht. Das durchgeführte Screening sollte erste Hinweise über die Auswirkungen der S-Lost-induzierten ROS-Bildung auf Gen-Ebene erbringen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7, Seite 51 und Tabelle 4.1, Seite 52 dargestellt. Alle untersuchten S-Lost-Konzentrationen führten in unseren Ergebnissen

zu signifikanten Expressionsänderungen der untersuchten Gene im Vergleich zur EtOH-Kontrolle. Eine differenzielle Genexpression wurde dabei bei einer mindestens 2-fach unterschiedlichen mRNA-Expressionsänderung angenommen, wenn zudem eine statistische Signifikanz ($p < 0,05$) durch die one-way ANOVA belegt werden konnte. Global über alle Gruppen konnte eine Änderung von 28 Genen festgestellt werden, was einer Beeinflussung von 33 % der untersuchten Gene entspricht. In der 30 μM S-Lost-Gruppe konnte sowohl eine Hoch- als auch Runter-Regulation von Genen verzeichnet werden. Mit steigender S-Lost-Konzentration verliert sich die Hoch-Regulation von Genen. So war bereits bei einer Konzentration von 100 μM S-Lost vornehmlich eine negative Gen-Regulation festzustellen. Dieser Trend setzte sich bei 300 μM S-Lost weiter fort. In dieser Gruppe waren ausschließlich negativ regulierte ROS-assoziierte Gene zu finden.

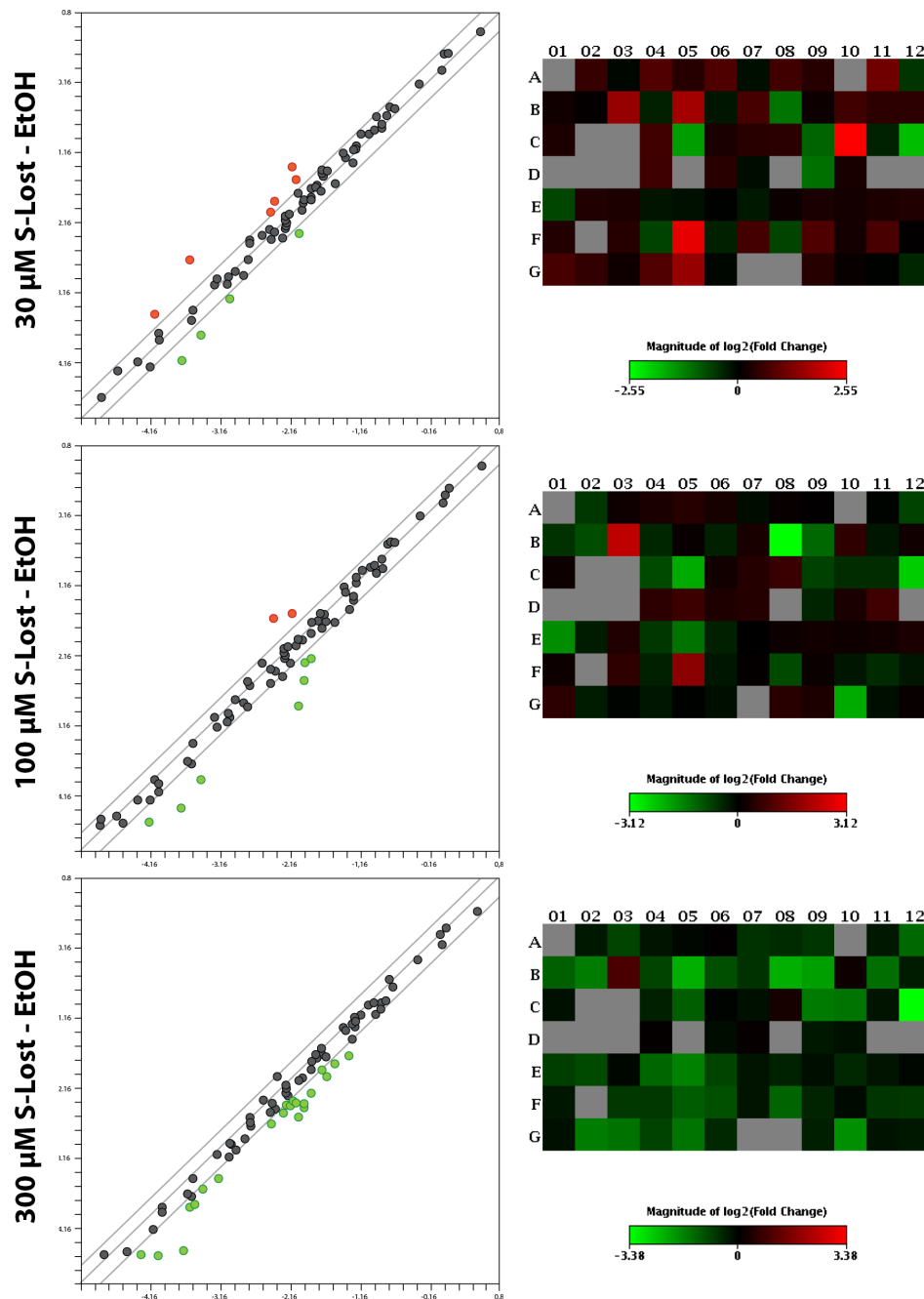


Abbildung 4.7: Genexpressionsänderung ROS-assoziiierter Gene nach S-Lost-Exposition. Mittels Gen-Array wurden 84 unterschiedliche mRNAs von ROS-assoziierten Genen 6 h nach 30, 100, oder 300 µM S-Lost-Exposition in Korrelation zur EtOH-Kontrollgruppe untersucht. Dargestellt sind auf der linken Seite die Scatter-Plots und rechts die heat-maps. Rote Punkte und rot-gefärbte Kacheln zeigen eine Hochregulation an, während die Farbe grün auf eine negative Regulation des untersuchten Gens hindeutet. Die Grenzen im Scatter-Plot wurden bei 2-fach differenzieller Genexpression eingezeichnet.

Tabelle 4.1: Relative Genexpressionsveränderung ROS-assoziiierter Gene nach S-Lost-Exposition. In der Tabelle sind ausschließlich Gene aufgeführt, bei denen eine > 2-fache Regulation feststellbar war. Während bei 30 μM S-Lost noch eine Hochregulation einiger Gene detektiert werden konnte, kehrt sich dieser Befund in eine negative Regulation bei höheren S-Lost-Konzentrationen um.

Protein	S-Lost [μM]		
	30	100	300
<i>Upregulation</i>			
CYGB	2,2		
DUSP1	2,9	5,1	
EPX	3,1		
HMOX1	5,9		
PTGS2	5,0	3,3	
SRXN1	2,9		
<i>Downregulation</i>			
DHCR24			-2,6
DUOX1			-2,4
DUOX2			-3,1
EPX			-5,0
FOXM1			-2,0
GCLC	-2,2	-8,7	-5,0
GCLM		-2,4	-4,3
GSR	-3,0	-4,3	-2,8
GTF2I			-3,1
HMOX1			-2,9
KRT1	-3,7	-5,8	-10,4
NCF1	-2,2		
NOX5		-3,3	
OXR1			-2,6
OXSRI		-2,6	-3,3
PTGS2			-2,3
PXDN			-2,1
SCARA3			-2,5
SOD2			-3,1
SOD3			-2,8
SRXN1			-2,9
TXNRD1		-4,3	-3,8

Wie aus den Ergebnissen ersichtlich wird, konnten nur 3 Gene (GCLC, GSR, KRT1) detektiert werden, bei denen in allen Gruppen eine gleichartige, in diesem Falle negative Regulation aufgezeigt werden konnten. Das GCLC-Gen kodiert die *Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*. Dieses Protein ist für die Bildung von Glutathion aus L-Cystein und L-Glutamat erforderlich.³⁵ Um ausreichend hohe zytosolische Glutathionspiegel aufrechterhalten zu können, wird die mitochondriale *Glutathione reductase* benötigt, die durch das GSR-Gen kodiert wird.³⁵ Offenbar wird die Reduktion von Glutathion nach einer S-Lost-Exposition nicht nur durch eine direkte Scavenger-Reaktion von GSH und S-Lost durch einen oxidativen GSH-Verbrauch verursacht, sondern S-Lost scheint auch einen direkten Einfluss auf den GSH-Metabolismus auszuüben. Bei KRT1 handelt es sich mit Keratin-1 um ein Strukturprotein der Keratinozyten.⁵⁵ Mutationen dieses Gens konnten mit der erblich-bedingten Erkrankung der *epidermolytischen Hyperkeratose* in Verbindung gebracht werden.⁵⁸ Diese kongenitale Erkrankung ist durch eine Epithelialisierungsstörung mit Erythemen und schwerer Blasenbildung charakterisiert – Befunde, die sich auch klinisch nach einer S-Lost-Exposition manifestieren.

Unter 30 μ M S-Lost werden folgende ROS-protektive Gene hochreguliert: CYGB (*Cytoglobin*), HMOX1 (*Heme oxygenase 1*), SRXN1 (*Sulfiredoxin-1*), EPX (*Eosinophil peroxidase*).

Offenbar werden bei niedrigen S-Lost-Expositionskonzentrationen in Keratinozyten ROS-Abwehrmechanismen aktiviert, die der S-Lost-vermittelten Toxizität entgegenwirken. Weiterhin wird in dieser Gruppe eine Hoch-Regulation von PTGS2 (*Prostaglandin G/H synthase 2*) beobachtet. Dieses Protein wird mit einer verstärkten Zelladhäsion assoziiert.¹⁰⁷ Eine S-Lost-induzierte Epidermolyse wird bei Konzentrationen um 150 μ M beschrieben.⁹⁴ Offenbar werden bei niedrigeren Expositionskonzentrationen defensive Mechanismen aktiviert. Bei höheren S-Lost-Konzentrationen kommen diese nicht mehr zum Tragen.

In der 300 μ M S-Lost-Gruppe kann ausschließlich eine Herab-Regulation der untersuchten Gene festgestellt werden. Dieses kann in einer allgemeinen Einschränkung der Zellfunktion mit reduzierter Transkription begründet sein. Im Ergebnis werden zum Einen keine protektiven Mechanismen aktiviert, zum Anderen werden anscheinend physiologisch vorhandene ROS-Abwehrenzyme reduziert. So wird die für die Glutathion-Homöostase relevante Gen GCLM (*Glutamate-cysteine ligase regulatory subunit*) mRNA mit zunehmender S-Lost-Konzentration weniger translatiert. Gleiches gilt für die ROS-protektiven Proteine HMOX1 (*Heme oxygenase 1*), EPX (*Eosinophil peroxidase*) und SRXN1 (*Sulfiredoxin-1*). Zusätzlich wird die Translation weiterer ROS-defensiver Gene wie beispielsweise OXR1 (*Oxidation resistance protein 1*), SCARA3 (*Scavenger*

receptor class A member 3) oder SOD (*Superoxide dismutase*) reduziert, was in einer verminderten ROS-Resistenz exponierter Keratinozyten resultieren könnte.

Zusammenfassend für die Gen-Array-Untersuchungen lässt sich festhalten, dass bei niedrigen S-Lost-Konzentrationen, die klinisch noch keine Blasenbildung zur Folge haben, eher ROS-protektive Mechanismen überwiegen. Bei zunehmenden S-Lost-Konzentrationen geht dieser ROS-defensive Aspekt verloren. Eine Verminderung ROS-defensiver Mechanismen scheint pathophysiologischen oxidativen Stress mit vermutlich starker Beeinträchtigung der Zellfunktion zur Folge zu haben.

Die Genexpressionsanalysen beruhen auf einer differentiellen Translation spezifischer mRNAs. Ein unmittelbarer Bezug zum spezifischen Protein gilt als wahrscheinlich, ist aber nicht beweisend. Daher wurden die Ergebnisse punktuell auf Proteinebene validiert. Im Western Blot (Abb. 4.8, S. 55) bestätigten sich die Daten für die GCLC (*Glutamate-cysteine ligase catalytic subunit*). Die weiteren Daten sind teilweise nicht in Einklang mit den Gen-Array Befunden zu bringen. So zeigte sich im Western Blot eine Zunahme der Proteinexpression von HMOX1 (*Heme oxygenase 1*) nicht bei 30 μ M S-Lost, sondern bei 100 μ M. Ebenso konnte zum Untersuchungszeitpunkt von 6 h tendenziell eher eine Zunahme der SOD1 (*Superoxide dismutase 1*) beobachtet werden. Zudem konnten im Western Blot eine Zunahme ROS-protektiver Proteine wie CAT (*Catalase*) oder TXN (*Thioredoxin*) nachgewiesen werden.

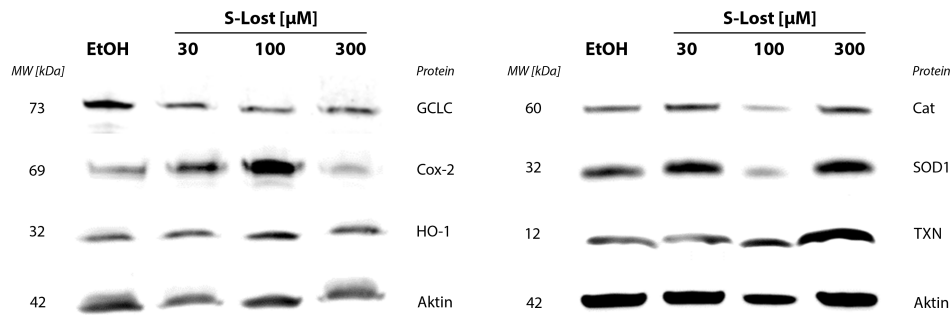


Abbildung 4.8: Western Blot Untersuchung ausgewählter Proteine. Nach Exposition von NHEK mit unterschiedlichen S-Lost-Konzentrationen wurde die Proteinexpression 6 h nach Exposition untersucht. Während das house-keeping Protein Aktin keine wesentlichen Schwankungen aufwies, zeigten sich Änderungen bei verschiedenen ROS-assoziierten Proteinen.

Diese vermeintliche Diskrepanz der Ergebnisse könnte auf einen zu frühen Untersuchungszeitpunkt von 6 h für die Western Blot Untersuchungen zurückzuführen sein. Eine abschließende Validierung der Gen-Array durch individuelle qPCR Untersuchungen sowie der Protein-Expressionsstudien im Zeitverlauf durch zusätzliche Western Blot, In-Cell Western oder immunzytochemische Untersuchungen ist für zukünftige Studien sinnvoll.

5 Ausblick

Die durchgeführten Untersuchungen konnten die Bildung von ROS als wichtigen Bestandteil der molekularen Toxikologie von S-Lost weiter untermauern. Die zugrunde liegenden Mechanismen scheinen vielfältig und bedürfen der genauen Klärung in weiteren Studien. Basierend auf den Ergebnissen erscheint der Einsatz von ROS-Scavengern sinnvoll und therapeutisch vielversprechend. In eigenen Versuchen wurde dieses initial untersucht. Dazu wurden N-Acetylcystein, ein etablierter ROS-Scavenger und Glutathion-precursos, sowie Glutathion genutzt, siehe Abbildung 5.1, Seite 57. Der Einsatz von N-Acetylcystein sowie Glutathion führte zu einer signifikanten Abnahme der S-Lost-induzierten Bildung von 8-Isoprostan. Bemerkenswerterweise gelang dieses sowohl im Rahmen einer Vorbehandlung – was klinisch einer prophylaktischen Einnahme von Medikamenten entsprechen würde –, als auch bei einer Intervention nach stattgefundener Exposition. Diese Ergebnisse decken sich bereits mit durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen. So konnten Antioxidantien S-Lost-induzierte Zellschäden *in vitro* verringern, die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine reduzieren und das Zellüberleben verbessern.^{8,11,41,83,90} Auch erste *in vivo* Studien konnten einen therapeutischen Benefit von NAC, GSH oder artverwandten Substanzen zeigen.^{64,65,71,104,105} Für die Therapie S-Lost-bedingter Zell- und Gewebeschäden sollte daher auf den Einsatz antioxidativer Substanzen nicht verzichtet werden. Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen gilt es in zukünftigen Studien zu untersuchen. Insbesondere sollten toxiko- als auch pharmakokinetische Studien durchgeführt werden, um optimale therapeutische Dosen und das therapeutische Zeitfenster zu finden.

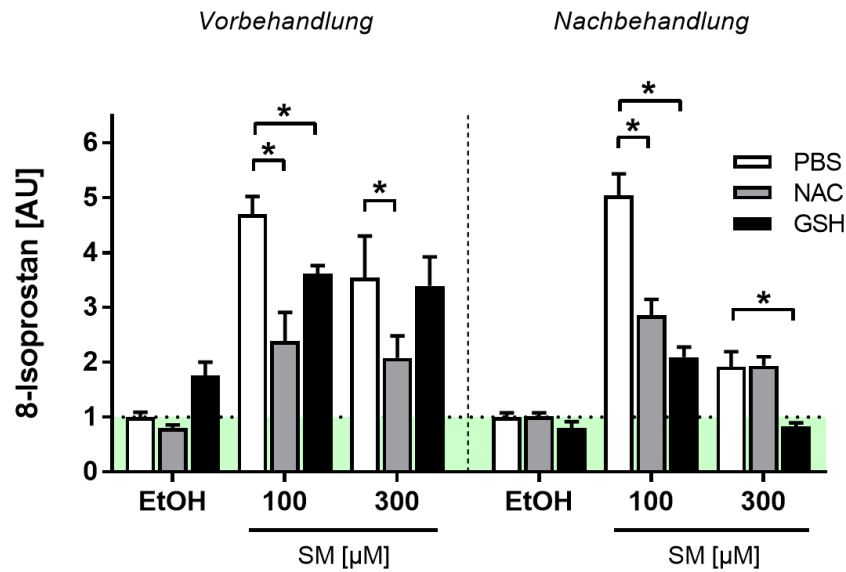


Abbildung 5.1: Einfluss von ROS-Scavengern auf die S-Lost-induzierte 8-Isoprostan-Bildung. NHEK wurden mit N-Acetylcystein (NAC, graue Balken) oder Glutathion (GSH, schwarze Balken) vorbehandelt und im Anschluss mit S-Lost exponiert. Alternativ erfolgte zuerst die Exposition der Zellen mit S-Lost und erst dann die Intervention mit NAC oder GSH. Die Medikament-Kontrollgruppen wurden in beiden Fällen mit PBS (weiße Balken) behandelt. Die 8-Isoprostan-Bildung wurde 3 d nach Exposition mittels ELISA analysiert. In beiden Ansätzen konnte eine signifikante Reduzierung der S-Lost-induzierten 8-Isoprostan-Bildung verzeichnet werden. NAC wies bei der Vorbehandlung etwas deutlichere Effekte auf, während GSH auch nach einer 300 μM S-Lost-Exposition in der Nachbehandlung signifikante Effekte zeigte. Dargestellt sind die normierten Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen. Die Normierung erfolgte auf das Signal der EtOH-Kontrolle (100 %; grüner Bereich). Statistische Unterschiede zwischen den S-Lost-Gruppen und der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) wurden mittels one-way ANOVA untersucht und markiert (* = $p < 0,05$). Fehlerbalken = SEM.

6 Literatur

1. *8-iso-PGF 2α ELISA kit* Manuscript. Enzo Life Sciences, Inc. (10 Executive Boulevard, Farmingdale, NY 11735, USA, Sep. 2016).
2. *8-Isoprostane Affinity Purification Kit* Manuscript. Cayman Chemical Company (1180 E. Ellsworth Rd., Ann Arbor, MI 48108, USA, 2014).
3. *8-Isoprostane EIA Kit* Manuscript. Cayman Chemical Company (1180 E. Ellsworth Rd., Ann Arbor, MI 48108, USA, 2013).
4. Adair, F. E. & Bagg, H. J. Experimental and clinical studies on the treatment of cancer by dichlorethylsulphide (mustard gas). *Ann Surg* **93**, 190–9 (1931).
5. Arroyo, C. M., Von Tersch, R. L. & Broomfield, C. A. Activation of alpha-human tumour necrosis factor (TNF-alpha) by human monocytes (THP-1) exposed to 2-chloroethyl ethyl sulphide (H-MG). *Hum Exp Toxicol* **14**, 547–53 (1995).
6. Assads mörderisches Arsenal chemischer Kampfstoffe. *Focus Online*. (15.07.2017). http://www.focus.de/wissen/mensch/tid-26654/hunderte-tote-in-syrien-assads-moerderisches-gift-arsenal-chemischer-kampfstoffe_aid_786811.html (2013).
7. Asserate, A. W. & Mattioli, A. *Der erste faschistische Vernichtungskrieg: Die italienische Aggression gegen Äthiopien 1935-1941* (SH-Verlag, 2006).
8. Atkins, K. B., Lodhi, I. J., Hurley, L. L. & Hinshaw, D. B. N-acetylcysteine and endothelial cell injury by sulfur mustard. *Journal of applied toxicology: JAT* **20**, 125–8 (2000).
9. Balali-Mood, M., Mousavi, S. & Balali-Mood, B. Chronic health effects of sulphur mustard exposure with special reference to Iranian veterans. *Emerg Health Threats J* **1**, e7 (2008).
10. Balszuweit, F., Menacher, G., Bloemeke, B., Schmidt, A., Worek, F., Thiermann, H. & Steinritz, D. Development of a co-culture of keratinocytes and immune cells for in vitro investigation of cutaneous sulfur mustard toxicity. *Chemico-biological interactions* **223**, 117–124 (2014).
11. Balszuweit, F., Menacher, G., Schmidt, A., Kehe, K., Popp, T., Worek, F., Thiermann, H. & Steinritz, D. Protective effects of the thiol compounds GSH and NAC against sulfur mustard toxicity in a human keratinocyte cell line. *Toxicology letters* **244**, 35–43 (2016).

12. Barnard, A. Death Toll From War in Syria Now 470,000, Group Finds. *The New York Times*. (15.07.2017). <https://www.nytimes.com/2016/02/12/world/middleeast/death-toll-from-war-in-syria-now-470000-group-finds.html> (2016).
13. Beesley, J. E. *Immunocytochemistry, A Practical Approach* (Oxford University Press, 1993).
14. BG Klinikum Hamburg, Abteilung für Handchirurgie, Plastische und Mikrochirurgie, Zentrum für Schwerbrandverletzte. *Copyright* (2013).
15. Bundeswehr Institute of Pharmacology and Toxicology, Munich. *Copyright* (2016).
16. *CellROX Oxidative Stress Reagents* Manuscript. Life Technologies Corporation (5791 Van Allen Way, Carlsbad, CA 92008, USA, 2012).
17. Chlorambucil; CID: 2708. *PubChem, Open Chemistry Database*. (15.07.2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/chlorambucil>.
18. Clemenson, C. J., Kristoffersson, H., Soerbo, B. & Ullberg, S. Whole Body Autoradiographic Studies of the Distribution of Sulphur 35-labelled Mustard Gas in Mice. *Acta Radiol Ther Phys Biol* **1**, 314–20 (1963).
19. Cullumbine, H. Medical aspects of mustard gas poisoning. *Nature* **159**, 151–3 (1947).
20. Cyclophosphamide; CID: 2907. *PubChem, Open Chemistry Database*. (15.07.2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2907>.
21. Dacre, J. C. & Goldman, M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard. *Pharmacological reviews* **48**, 289–326 (1996).
22. Daunerer, M. *Klinische Toxikologie: Giftinformation, Giftnachweis, Vergiftungstherapie* (Ecomed, 1984).
23. Davison, C., Rozman, R. S. & Smith, P. K. Metabolism of bis-beta-chloroethyl sulfide (sulfur mustard gas). *Biochemical pharmacology* **7**, 65–74 (1961).
24. Dickel, H., Fincke, A. & Gohr, H. Poisoning with beta-, beta dichloroethylsulfid. *Med Tech* **20**, 686–90 (1952).
25. *Die Haager Landkriegsordnung: nebst Anlagen und Ergänzungen* (Europäischer Hochschulverlag, 2010).
26. Dixon, M. & Needham, D. M. Biochemical research on chemical warfare agents. *Nature* **158**, 432–8 (1946).
27. Doppelt so viele Tote wie bisher angenommen. *Zeit Online*. (15.07.2017). <http://www.zeit.de/gesellschaft/zeitgeschehen/2016-02/syrien-krieg-bilanz-bericht-tote-bevoelkerung-verletzte> (2016).

28. Drasch, G., Kretschmer, E., Kauert, G. & von Meyer, L. Concentrations of mustard gas [bis(2-chloroethyl)sulfide] in the tissues of a victim of a vesicant exposure. *J Forensic Sci* **32**, 1788–93 (1987).
29. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological reviews* **82**, 47–95 (2002).
30. Eldad, A., Ben Meir, P., Breiterman, S., Chaouat, M., Shafran, A. & Ben-Bassat, H. Superoxide dismutase (SOD) for mustard gas burns. *Burns* **24**, 114–9 (1998).
31. Emad, A. & Rezaian, G. R. The diversity of the effects of sulfur mustard gas inhalation on respiratory system 10 years after a single, heavy exposure: analysis of 197 cases. *Chest* **112**, 734–8 (1997).
32. Feister, A. J. *Medical Defense Against Mustard Gas: Toxic Mechanisms and Pharmacological Implications* (Taylor & Francis, 1991).
33. Frucht, A. H. Die höhere Form des Tötens. *Zeit Online*. (15.07.2017). <http://www.zeit.de/1983/35/die-hoehere-form-des-toetens> (1983).
34. Fürtig, H. *Der Irakisch-Iranische Krieg 1980-1988: Ursachen, Verlauf, Folgen* (Akademie Verlag, 1992).
35. GCLC Gene. *Gene Cards, Human Gene Database*. (15.07.2017). <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=GCLC>.
36. Gellermann, G. W. *Der Krieg, der nicht stattfand* (Bernard & Graefe, 1986).
37. Ghabili, K., Agutter, P. S., Ghanei, M., Ansarin, K. & Shoja, M. M. Mustard gas toxicity: the acute and chronic pathological effects. *J Appl Toxicol* **30**, 627–43 (2010).
38. Ghanei, M. & Harandi, A. A. Long term consequences from exposure to sulfur mustard: a review. *Inhal Toxicol* **19**, 451–6 (2007).
39. Ghanei, M., Naderi, M., Kosar, A. M., Harandi, A. A., Hopkinson, N. S. & Poursaleh, Z. Long-term pulmonary complications of chemical warfare agent exposure in Iraqi Kurdish civilians. *Inhal Toxicol* **22**, 719–24 (2010).
40. Gras drueber. *Der Spiegel* **3**, 64–65 (1995).
41. Gross, C. L., Innace, J. K., Hovatter, R. C., Meier, H. L. & Smith, W. J. Biochemical manipulation of intracellular glutathione levels influences cytotoxicity to isolated human lymphocytes by sulfur mustard. *Cell biology and toxicology* **9**, 259–67 (1993).
42. Gupta, R. C. *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents* 93–108 (Elsevier, 2009).
43. Guthrie, F. Ueber einige Derivate der Kohlenwasserstoffe C_nH_n. *European Journal of Organic Chemistry* **113**, 266–288 (1860).

44. Harris, R. & Paxman, J. *A Higher Form of Killing: The Secret History of Chemical and Biological Warfare* (Random House Publishing Group, 2007).
45. Ho, E., Galougahi, K. K., Liu, C.-C., Bhindi, R. & Figtree, G. A. Biological markers of oxidative stress: applications to cardiovascular research and practice. *Redox biology* **1**, 483–491 (2013).
46. Ifosfamide; CID: 3690. *PubChem, Open Chemistry Database*. (15.07.2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3690>.
47. Illig, L., Paul, E., Eyer, P., Weger, N. & Born, W. Treatment of psoriasis vulgaris with external sulfur mustard gas with particular reference to its potential carcinogenic risk. III. Clinical and experimental studies on the extent of percutaneous and inhalational uptake of sulfur mustard gas. *Z Hautkr* **54**, 941–51 (1979).
48. Joppien, S., Maier, S. L. & Wendling, D. *BASICS Experimentelle Doktorarbeit* 24–103 (Elsevier, 2011).
49. Karow, T. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie* 907–938 (Ruth Lang-Roth, 2013).
50. Katscher, F. Warum Hitler kein Giftgas einsetzte. *Wiener Zeitung*. (15.07.2017). http://www.wienerzeitung.at/nachrichten/archiv/199494_Warum-Hitler-kein-Giftgas-einsetzte.html (2001).
51. Kehe, K. & Balszuweit, F. Sulfur mustard research-strategies for the development of improved medical therapy. *Eplasty* **8**, 32 (2008).
52. Kehe, K. & Szinicz, L. Medical aspects of sulphur mustard poisoning. *Toxicology* **214**, 198–209 (2005).
53. Kehe, K., Thiermann, H., Balszuweit, F., Eyer, F., Steinritz, D. & Zilker, T. Acute effects of sulfur mustard injury-Munich experiences. *Toxicology* **263**, 3–8 (2009).
54. Klinke, R., Pape, H., A., K. & S., S. *Physiologie* 881–882 (Thieme, 2010).
55. KRT1 keratin 1; Gene ID: 3848. *NCBI, Gene*. (15.07.2017). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3848> (Juni 2017).
56. Kunz, R. & Müller, R. D. *Giftgas gegen Abd el Krim: Deutschland, Spanien und der Gaskrieg in Spanisch-Marokko, 1922-1927* (Rombach, 1990).
57. Künzi, G. B. *Italien und der Abessinienkrieg 1935/36: Kolonialkrieg oder Totaler Krieg?* (Schöningh, 2002).
58. Lacz, N. L., Schwartz, R. A. & Kihiczak, G. Epidermolytic hyperkeratosis: a keratin 1 or 10 mutational event. *International journal of dermatology* **44**, 1–6 (2005).

59. Levitt, J. M., Lodhi, I. J., Nguyen, P. K., Ngo, V., Clift, R., Hinshaw, D. B. & Sweeney, J. F. Low-dose sulfur mustard primes oxidative function and induces apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *Int Immunopharmacol* **3**, 747–56 (2003).
60. Lynch, V., Smith, H. & Marshall Jr, E. On dichlorethylsulphide (mustard gas). I. The systemic effects and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut* **12**, 265–290 (1918).
61. Mahmood, T. & Yang, P.-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American journal of medical sciences* **4**, 429 (2012).
62. Maisonneuve, A., Callebat, I., Debordes, L. & Coppet, L. Biological fate of sulphur mustard in rat: toxicokinetics and disposition. *Xenobiotica* **23**, 771–80 (1993).
63. Marrs, T. C., Maynard, R. L. & Sidell, F. R. *Chemical Warfare Agents: Toxicology and Treatment* 375–408 (John Wiley & Sons, 1996).
64. McClintock, S. D., Hoesel, L. M., Das, S. K., Till, G. O., Neff, T., Kunkel, R. G., Smith, M. G. & Ward, P. A. Attenuation of half sulfur mustard gas-induced acute lung injury in rats. *Journal of applied toxicology: JAT* **26**, 126–31 (2006).
65. McElroy, C. S., Min, E., Huang, J., Loader, J. E., Hendry-Hofer, T. B., Garlick, R. B., Rioux, J. S., Veress, L. A., Smith, R., Osborne, C., Anderson, D. R., Holmes, W. W., Paradiso, D. C., White, C. W. & Day, B. J. From the Cover: Catalytic Antioxidant Rescue of Inhaled Sulfur Mustard Toxicity. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology* **154**, 341–353 (2016).
66. Meyer, V. Ueber Thiodiglykolverbindungen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **19**, 3259–3266 (1886).
67. Morrow, J. D., Frei, B., Longmire, A. W., Gaziano, J. M., Lynch, S. M., Shyr, Y., Strauss, W. E., Oates, J. A. & Roberts, L. J. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F2-isoprostanes) in smokers - smoking as a cause of oxidative damage. *New England Journal of Medicine* **332**, 1198–1203 (1995).
68. Morrow, J. D., Hill, K. E., Burk, R. F., Nammour, T. M., Badr, K. F. & Roberts, L. J. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **87**, 9383–9387 (1990).
69. Morrow, J. D. & Roberts, L. J. The isoprostanes: current knowledge and directions for future research. *Biochemical pharmacology* **51**, 1–9 (1996).
70. Morrow, J., Moore, K., Awad, J., Ravenscraft, M., Marini, G., Badr, K. F., Williams, R. & Roberts 2nd, L. Marked overproduction of non-cyclooxygenase derived prostanoids (F2-isoprostanes) in the hepatorenal syndrome. *Journal of lipid mediators* **6**, 417–420 (1992).

71. Mukherjee, S., Stone, W. L., Yang, H., Smith, M. G. & Das, S. K. Protection of half sulfur mustard gas-induced lung injury in guinea pigs by antioxidant liposomes. *Journal of biochemical and molecular toxicology* **23**, 143–53 (2009).
72. Mulisch, M. & Welsch, U. *Romeis Mikroskopische Technik* 39–418 (Spektrum, 2010).
73. Munro, N. B., Watson, A. P., Ambrose, K. R. & Griffin, G. D. Treating exposure to chemical warfare agents: implications for health care providers and community emergency planning. *Environ Health Perspect* **89**, 205–15 (1990).
74. Mustard Gas; CID: 10461. *PubChem, Open Chemistry Database*. (15.07.2017). <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10461>.
75. Naghii, M. Sulfur mustard intoxication, oxidative stress, and antioxidants. *Military medicine* **167**, 573 (2002).
76. Nagy, S. M., Golumbic, C. & et al. The penetration of vesicant vapors into human skin. *J Gen Physiol* **29**, 441–69 (1946).
77. Netter, F. H. *NETTERS Dermatologie* 190–192 (Thieme, 2006).
78. Niemann, A. Ueber die Einwirkung des braunen Chlorschwefels auf Elaylgas. *European Journal of Organic Chemistry* **113**, 288–292 (1860).
79. Ogawa, F., Shimizu, K., Muroi, E., Hara, T., Hasegawa, M., Takehara, K. & Sato, S. Serum levels of 8-isoprostane, a marker of oxidative stress, are elevated in patients with systemic sclerosis. *Rheumatology* **45**, 815–818 (2006).
80. OPCW Member States. *Organisation for the Prohibition of Chemical Weapons*. (15.07.2017). <https://www.opcw.org/about-opcw/member-states/> (2017).
81. Papirmeister, B., Gross, C. L., Meier, H. L., Petralli, J. P. & Johnson, J. B. Molecular basis for mustard-induced vesication. *Fundam Appl Toxicol* **5**, 134–49 (1985).
82. Papirmeister, B., Gross, C., Petralli, J. & Meier, H. Pathology produced by sulphur mustard in human skin grafts on athymic nude mice. *J Toxicol Cutaneous Ocul Toxicol* **3**, 393–408 (1984).
83. Paromov, V., Qui, M., Yang, H., Smith, M. & Stone, W. L. The influence of N-acetyl-L-cysteine on oxidative stress and nitric oxide synthesis in stimulated macrophages treated with a mustard gas analogue. *BMC cell biology* **9**, 33 (2008).
84. Paromov, V., Suntres, Z., Smith, M. & Stone, W. L. Sulfur mustard toxicity following dermal exposure: role of oxidative stress, and antioxidant therapy. *Journal of burns and wounds* **7**, 7 (2007).
85. Pechura, C. M., Rall, D. P. *u. a.* Veterans at Risk: The Health Effects of Mustard Gas and Lewisite. *National Academies Press* **1**, 156–165 (1993).

86. *Protein Determination Kit* Manuscript. Cayman Chemical Company (1180 E. Ellsworth Rd., Ann Arbor, MI 48108, USA, 2010).
87. Rassow, J., Hauser, K., R., N. & R., D. *Biochemie* 492–496, 661–663 (Thieme, 2008).
88. Reichsgesetzblatt. *Österreichische Nationalbibliothek*. (15.07.2017), 174–177 (1929).
89. Renshaw, B. Mechanism in production of cutaneous injuries by sulphur and nitrogen mustards. *Chemical warfare agents and related chemical problems* **1**, 479–518 (1946).
90. Saberi, M. & Mahmodabady, A. Z. The protective effects of N-Acetyl-cysteine, oxo-thiazolidine-carboxylate, acetaminophen and their combinations against sulfur mustard cytotoxicity on human skin fibroblast cell line (HF2FF). *Iranian Biomedical Journal* **13**, 215–221 (2009).
91. Sahebkar, A., Antonelli-Incalzi, R., Panahi, Y., Ghanei, M. & Pedone, C. Mustard lung and COPD: common features and treatment? *Lancet Respir Med* **3**, 747–8 (2015).
92. Sasse, D. *Franzosen, Briten und Deutsche im Rifkrieg 1921-1926* (Oldenbourg, 2006).
93. Schmidt, R., Lang, F. & Heckmann, M. *Physiologie des Menschen* 880–883 (Springer, 2010).
94. Smith, W., Sanders, K., Ruddle, S. & Gross, C. Cytometric analysis of DNA changes induced by sulfur mustard. *Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology* **12**, 337–347 (1993).
95. Stein, C. M., Tanner, S. B., Awad, J. A., Roberts, L. J. & Morrow, J. D. Evidence of free radical-mediated injury (isoprostane overproduction) in scleroderma. *Arthritis & Rheumatism* **39**, 1146–1150 (1996).
96. Steinritz, D., Elischer, A., Balszuweit, F., Gonder, S., Heinrich, A., Bloch, W., Thiermann, H. & Kehe, K. Sulphur mustard induces time- and concentration-dependent regulation of NO-synthesizing enzymes. *eng. Toxicology letters* **188**, 263–9 (2009).
97. Steinritz, D., Striepling, E., Rudolf, K.-D., Schröder-Kraft, C., Püschel, K., Hullard-Pulstinger, A., Koller, M., Thiermann, H., Gandor, F., Gawlik, M. u. a. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. *Toxicology letters* **244**, 112–120 (2016).

98. Steinritz, D., Striepling, E., Rudolf, K.-D., Schröder-Kraft, C., Püschel, K., Hullard-Pulstinger, A., Koller, M., Thiermann, H., Gandor, F., Gawlik, M. & John, H. Medical documentation, bioanalytical evidence of an accidental human exposure to sulfur mustard and general therapy recommendations. *Toxicology letters* **244**, 112–120 (2016).
99. Sterry, W. & Paus, R. *Checkliste Dermatologie: Venerologie, Allergologie, Phlebologie, Andrologie* 298, 484 (Thieme, 2004).
100. Strey, K. *Die Welt der Gifte* (Lehmanns, 2011).
101. Sulzberger, M. B., Baer, R. L. & et al. Skin sensitization to vesicant agents of chemical warfare. *J Invest Dermatol* **8**, 365–93 (1947).
102. Tahmasbpour, E., Reza Emami, S., Ghanei, M. & Panahi, Y. Role of oxidative stress in sulfur mustard-induced pulmonary injury and antioxidant protection. *Inhalation toxicology* **27**, 659–672 (2015).
103. Talpur, R., Venkatarajan, S. & Duvic, M. Mechlorethamine gel for the topical treatment of stage IA and IB mycosis fungoides-type cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Rev Clin Pharmacol* **7**, 591–7 (2014).
104. Tewari-Singh, N., Agarwal, C., Huang, J., Day, B. J., White, C. W. & Agarwal, R. Efficacy of glutathione in ameliorating sulfur mustard analog-induced toxicity in cultured skin epidermal cells and in SKH-1 mouse skin in vivo. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **336**, 450–9 (2011).
105. Tewari-Singh, N., Inturi, S., Jain, A. K., Agarwal, C., Orlicky, D. J., White, C. W., Agarwal, R. & Day, B. J. Catalytic antioxidant AEOL 10150 treatment ameliorates sulfur mustard analog 2-chloroethyl ethyl sulfide-associated cutaneous toxic effects. *Free radical biology & medicine* **72**, 285–95 (2014).
106. Thiermann, H., Worek, F. & Kehe, K. Limitations and challenges in treatment of acute chemical warfare agent poisoning. *Chem Biol Interact* **206**, 435–43 (2013).
107. Tsujii, M. & DuBois, R. N. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* **83**, 493–501 (1995).
108. Übereinkommen über das Verbot chemischer Waffen (CWÜ). Bundesamt für Wirtschaft und Ausfuhrkontrolle. (15.07.2017). http://www.bafa.de/DE/Aussenwirtschaft/Chemiewaffenuerebereinkommen/Vertragsstaaten/vertragsstaaten_node.html (2016).
109. Vohr, H.-W. *Toxikologie: Band 2 Toxikologie der Stoffe* 214–220 (Wiley-VCH, 2010).
110. Vom Himmel hoch. *Der Spiegel*. (15.07.2017). <http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-30458405.html> (1988).

111. Wang, S., Leonard, S. S., Castranova, V., Vallyathan, V. & Shi, X. The role of superoxide radical in TNF-alpha induced NF-kappaB activation. *Annals of clinical and laboratory science* **29**, 192–199 (1999).
112. Wang, X., Fang, H., Huang, Z., Shang, W., Hou, T., Cheng, A. & Cheng, H. Imaging ROS signaling in cells and animals. *Journal of Molecular Medicine* **91**, 917–927 (2013).
113. Wang, Z., Ciabattoni, G., Creminon, C., Lawson, J., Fitzgerald, G. A., Patrono, C. & Macclouf, J. Immunological characterization of urinary 8-epi-prostaglandin F2 alpha excretion in man. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **275**, 94–100 (1995).
114. Weber, W. M., Kracko, D. A., Lehman, M. R., Irvin, C. M., Blair, L. F., White, R. K., Benson, J. M., Grotendorst, G. R., Cheng, Y. S. & McDonald, J. D. Inhalation exposure systems for the development of rodent models of sulfur mustard-induced pulmonary injury. *Toxicol Mech Methods* **20**, 14–24 (2010).
115. Weidringer, J. W. *Katastrophenmedizin, Leitfaden für die ärztliche Versorgung im Katastrophenfall* 433 (Bundesamt für Bevölkerungsschutz und Katastrophenhilfe, 2003).
116. Zojaji, R. & Mazloun Farsi Baf, M. *Basic and Clinical Toxicology of Mustard Compounds* 135–170 (Springer, 2015).

7 Danksagung

Mein Dank gilt all denjenigen Personen, die mir diese Arbeit ermöglicht und mich dabei nach besten Kräften unterstützt haben.

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Franz Worek für die Bereitstellung des Dissertationsthemas und der Ermöglichung dieser Forschungsarbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Dirk Steinritz für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für die immer vorhandene Zeit und Diskussionsbereitschaft, für die fachliche Kompetenz und Motivation.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Tanja Popp für die großartige Unterstützung in der Ergebnisauswertung sowie dem gesamten MTA-Team für die exzellente Einarbeitung in die zellbiologischen Methoden und Auswertungen.

Danken möchte ich außerdem dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Horst Thiermann für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der erforderlichen Gerätschaften.

Den größten Dank bin ich meinen Eltern verpflichtet. Ich danke euch für die jahrelange Unterstützung, für eure Liebe und Verwirklichung meines Traums. Ohne euch hätte ich das alles nicht geschafft.

Ich danke euch, Martin und Markus, für eure Anregungen und eure Motivation. Für eure Ablenkung, damit ich wieder klaren Kopf fassen konnte.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Ehemann, Thomas. Weil du immer an mich geglaubt und mir Mut gemacht hast. Danke, für deine aufbauenden Worte nach langen Tagen und deiner tiefen Liebe.

8 Curriculum vitae

Sabine Loitsch, geb. Block

Geburtsdatum: 24. Mai 1990
Geburtsort: Siegburg
Eltern: Jürgen Block und Heike Block, geb. Schumacher
Geschwister: Martin Block, Markus Block
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Konfession: römisch-katholisch

Beruflicher Werdegang

04/2018 - heute Werdenfelser Kaserne Murnau, Truppenarzt
03/2016 - 03/2018 Bundeswehrkrankenhaus Ulm, Abteilung Psychiatrie
03/2013 - 10/2016 Experimentelle Doktorarbeit
Institut für Pharmakologie und Toxikologie in München

Studium der Humanmedizin

11/2015 3. Staatsexamen
10/2014 2. Staatsexamen
10/2011 - 08/2015 Klinisches Studium an der LMU München
09/2011 1. Staatsexamen
10/2009 - 08/2011 Vorklinisches Studium an der LMU München

Schulbildung

08/2005 - 07/2009 Carl-Friedrich-von-Siemens-Gymnasium, Berlin
10/2003 - 07/2005 Gymnasium Siegburg Alleestraße, Nordrhein-Westfalen
07/2002 - 10/2003 Carl-Friedrich-von-Siemens-Gymnasium, Berlin
07/2000 - 06/2002 Evangelischen Grundschule Spandau, Berlin
07/1996 - 06/2000 Gemeinschaftsgrundschule Marmagen, Nordrhein-Westfalen